Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

L-Leucinamid- und L-Leucyl-arylamide-spaltende Enzyme im Corpus luteum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jörg Wandel
aus Tübingen

1968

9686

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547604_0055

Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

L-Leucinamid- und L-Leucyl-arylamide-spaltende Enzyme im Corpus luteum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jörg Wandel
aus Tübingen

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. W. Graumann

1.Berichterstatter: Dozent Dr. med. G. Jung
(Professor Dr. med. H. Roemer)

2.Berichterstatter: Dozent Dr. med. D. Klaus

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v.Spangenberg KG · Tübingen

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Herrn Dozent Dr. Jung danke ich für die Überlassung des Themas und seine wertvollen Hinweise. Herrn Dr. med. V. Unbehaun bin ich für seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit zu herzlichem Dank verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Leucinaminopeptidase (LAP) und L-Leucinamid-($LeuNH_2$-)spaltende Enzyme	2
III.	Leucinaminopeptidase (LAP) und L-Leucyl-arylamide-spaltende Enzyme	4
	1. Substratspezifität	4
	2. intrazelluläre Lokalisation	4
	3. Aktivierbarkeit durch Metallionen	5
	4. elektrophoretisches und chromatographisches Verhalten	6
IV.	Aminosäurearylamidasen (AAA)	8
V.	Methodik	10
VI.	Ergebnisse	20
	1. Zellfraktionierung	20
	2. Trennung der $LeuNH_2$-spaltenden von der L-Leucyl-arylamide-spaltenden Aktivität mit Hilfe der kombinierten Zink-Hitze-Behandlung des Extraktes	23
	3. Beeinflussung der Enzymaktivität durch Mn^{++}-Ionen	26
	4. Hemmung der Enzymaktivität durch EDTA	31
	5. Inaktivierung der Enzymaktivität durch Einfrieren, Lagerung und Auftauen	32
	6. Säulenchromatographische Untersuchungen	33
VII.	Diskussion	39
VIII.	Zusammenfassung	46
IX.	Literaturverzeichnis	48

Lebenslauf

I. EINLEITUNG

Durch Untersuchungen verschiedener Autoren wurde auf die Heterogenität von L-Leucyl-β-naphthylamid (LEUNA)-spaltenden und als Leucinaminopeptidasen (LAP) bezeichneten Enzymen hingewiesen. Es war deshalb von Interesse, ob auch das erstmals im Jahre 1962 von JUNG (13) in den verschiedenen Anteilen vom Ovarium nachgewiesene und beschriebene LEUNA-spaltende Enzym verschiedene Komponenten aufweisen könnte. Nachdem BEHAL, KANAVAGE u. HAMILTON (2) ein im Serum von gesunden erwachsenen Personen vorkommendes LEUNA-spaltendes Enzym an DEAE-Cellulose säulenchromatographisch in 4 Fraktionen trennten, gelang es auch MAHLER (19), das in der Follikelflüssigkeit, im Corpus rubrum, Corpus luteum und Corpus albicans vom Schweineovar vorkommende und bisher als einheitlich beschriebene LEUNA-spaltende Enzym an DEAE-Sephadex säulenchromatographisch in 5 Fraktionen aufzutrennen. Inzwischen war aber durch eine Reihe von Versuchen nachgewiesen worden, daß LEUNA außer von der LAP noch viel besser von einer Reihe weiterer Peptidasen umgesetzt wird (17, 25, 26, 27, 37, 41). Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es sein, die von MAHLER (19) im Ovarium vom Schwein gefundene Heterogenität der LEUNA-spaltenden Aktivität genauer zu untersuchen. Es sollte geprüft werden, ob auch hier eine weitere Differenzierung unterschiedlicher Enzymaktivitäten möglich ist.

II. LEUCINAMINOPEPTIDASE (LAP) UND L-LEUCINAMID-($LeuNH_2$-) SPALTENDE ENZYME

Nachdem es 1955 SPACKMAN, SMITH u. BROWN (35), sowie 1962 FASOLD, LINHARD u. TURBA (6) gelang, die LAP aus Schweinenieren zu isolieren, konnten 1963 SPECTOR (36) und 1965 HANSON, GLÄSSER u. KIRSCHKE (11) dasselbe Enzym aus Rinderaugenlinsen in reiner Form gewinnen. Es handelt sich um ein Protein mit dem Molekulargewicht von 326 000 (11, 16). Als N-terminale Aminosäuren wurden Glycin und Glutaminsäure, sowie Histidin und Glutaminsäure nachgewiesen (7). Das Enzym benötigt Mn^{++} und Mg^{++} für seine Aktivität, wobei Mn^{++} stärker aktiviert als Mg^{++} (34). Es wird angenommen, daß das Enzymprotein unter Vermittlung dieser Ionen mit dem Substrat in mehreren Schritten und an 3 verschiedenen Stellen in Wechselwirkung tritt (34). Als Substrate werden zahlreiche Peptide, wie L-Leucinamid ($LeuNH_2$), L-Leucyl-glycin, L-Leucyl-glycyl und DL-α-Amino-n-butyramid hydrolysiert (34). Alle diese Substrate werden jedoch auch von anderen Peptidasen gespalten (12). Als Ausnahme wurde lange Zeit das $LeuNH_2$ betrachtet. Es konnte aber durch verschiedene Untersuchungen nachgewiesen werden, daß auch $LeuNH_2$ außer von der LAP noch von anderen Peptidasen hydrolysiert wird (24, 26, 27). So trennten NAKAGAWA u. TSUJI (24) im Serum von Gesunden durch Stärkeelektrophorese 2 Gipfel $LeuNH_2$-spaltender Aktivität voneinander, die andere Eigenschaften als die der LAP aufwiesen. Im Gegensatz zur LAP wurden diese Enzyme durch Mn^{++} gehemmt. Das pH-Optimum lag bei 7,0, während das der LAP zwischen 8,0 und 9,2 liegt. Im Serum von Hepatitiskranken erhielten diese Autoren 2 zusätzliche Gipfel $LeuNH_2$-spaltender Aktivität, deren Eigenschaften weitgehend mit denen der LAP übereinstimmten, so daß Isoenzyme der LAP angenommen wurden. Ebenfalls mehrere Gipfel $LeuNH_2$-spaltender Aktivität erhielten PATTERSON, HSIAO u. KEPPEL (26) durch DEAE-Cellulose-Chromatographie von Cytoplasma aus Mäuseascitestumoren. Es konnte aber nur ein einziger Gipfel auf die LAP zurückgeführt werden. Schließlich gelang es PATTERSON, HSIAO, KEPPEL u. SOROF (27) durch Elektrophorese eine $LeuNH_2$-spaltende und durch Mn^{++} aktivierbare Aminopeptidase von der LAP zu trennen. Möglicherweise gehört auch das von KRESSER u. WORASCHK (15) in menschlichem Fruchtwasser nachgewiesene $LeuNH_2$-spaltende, aber nicht durch Mn^{++} aktivierbare Enzym zu dieser Gruppe von $LeuNH_2$-spaltenden Enzymen, die von der eigentlichen LAP unterschieden werden können.

Da, wie alle diese Ergebnisse besagen, außer der LAP noch andere $LeuNH_2$-spal-

tende Enzyme existieren, steht für die quantitative Bestimmung der LAP kein voll befriedigendes Substrat zur Verfügung. Es geht aber aus den Elektrophero-grammen und Chromatogrammen hervor, daß von diesen $LeuNH_2$-spaltenden Enzymen die LAP mit Abstand die höchsten Spaltungsraten aufweist. $LeuNH_2$ sollte somit als das schlechthin optimale Substrat der LAP angesehen werden. Eine exakte quantitative Bestimmung der LAP ist deshalb heute noch nicht ohne Einschränkung möglich.

III. LEUCINAMINOPEPTIDASE (LAP) UND L-LEUCYL-ARYLAMIDE-SPALTENDE ENZYME

1. Substratspezifität

Neben $LeuNH_2$ wurden früher als weitere Substrate für die quantitative Bestimmung der LAP die beiden L-Leucyl-arylamide L-Leucyl-β-naphthylamid (LEUNA) und L-Leucyl-p-nitroanilid (LEUPA) verwendet. Durch genauere Untersuchungen konnte aber nachgewiesen werden, daß an der Hydrolyse von LEUNA bzw. LEUPA noch andere Peptidasen beteiligt sind (1, 5, 22, 23, 25, 26, 27, 32, 27). So verglichen NAGEL, WILLIG u. SCHMIDT (22) in normalen und pathologischen menschlichen Seren die LEUNA-, LEUPA- und $LeuNH_2$-Spaltung miteinander. Es zeigte sich, daß die Umsatzraten von LEUNA mit denen von LEUPA übereinstimmten. Die Autoren schlossen daraus, daß LEUPA für das schwerer zu handhabende und überdies carcinogene LEUNA eingesetzt werden kann. Demgegenüber wurde $LeuNH_2$ regelmäßig langsamer als die beiden L-Leucyl-arylamide hydrolysiert. Der Quotient der Umsatzraten L-Leucyl-arylamide/$LeuNH_2$ war aber nicht konstant und schwankte zwischen 28 und 2,3. Da im Gegensatz dazu hochgereinigte LAP $LeuNH_2$ 10 000 - 20 000 mal schneller als LEUNA spaltet (27), wurde angenommen, daß die L-Leucyl-arylamid-Hydrolyse im Serum nur zu einem sehr geringen Teil von der LAP katalysiert wird.

2. intrazelluläre Lokalisation

Weitere Hinweise für das Vorliegen verschiedener Enzyme konnten durch Fraktionieren von Zellhomogenaten erhalten werden. So wurde $LeuNH_2$ in Ascitestumorzellen von Mäusen (26), in Rattenleber (27) und in Rattenniere (21, 20) jeweils überwiegend in der Cytoplasmafraktion gespalten. Im Gegensatz zu diesen einheitlichen Ergebnissen kamen mehrere Autoren bei der Lokalisation der L-Leucyl-arylamide-spaltenden Aktivität zu differierenden Befunden (21, 26, 31, 32). Während die LEUNA-spaltenden Aktivitäten aus Mäuseascitestumorzellen (26), aus Rattenleber (21) und aus Skelettmuskulatur (21) vorwiegend in der Cytoplasmafraktion gemessen wurden, tritt in Rattenniere (21) die LEUNA-Hydrolyse überwiegend in der Mikrosomenfraktion auf. Im Schweineovar (31) fanden sich die höchsten LEUNA-spaltenden Aktivitäten in der Mitochondrien-

fraktion, im menschlichen carcinomatös entarteten Ovar (31) hingegen in der Zellkernfraktion. In menschlicher Leber (32) schließlich ist die LEUNA-Hydrolyse in allen Zellfraktionen etwa gleich hoch.

Wie diese Ergebnisse zeigen, unterstreichen die deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation der $LeuNH_2$- und der LEUNA-spaltenden Aktivität die verschiedene Natur der zugrunde liegenden Enzyme. Die uneinheitliche Lokalisation der LEUNA-spaltenden Enzyme ihrerseits bekräftigt ihre von MAHLER nachgewiesene Heterogenität.

3. Aktivierbarkeit durch Metallionen

Während LAP aus Schweineniere oder Rinderaugenlinse durch Mn^{++} und Mg^{++} aktiviert wird (27, 12), beeinflussen diese Metallionen die L-Leucyl-arylamid-Hydrolyse nicht (5, 8, 21), oder vermögen sie sogar zu hemmen (5, 10, 26). Die LEUNA-Hydrolyse kann aber, wie SMITH, KAUFMAN u. RUTENBURG (32) an einem teilweise gereinigten und aus menschlicher Leber stammendem Enzym zeigen konnten, durch Co^{++} aktiviert werden. Auch WEBER (39) erzielte im menschlichen Serum eine Aktivierung der LEUNA-Spaltung durch Co^{++}. WOLFF u. RESNIK (41) beobachteten in Extrakt aus Rinderaugenlinsen eine Aktivierung der LEUNA-Hydrolyse durch Co^{++}, Mn^{++} und Mg^{++}, wobei Co^{++} einen synergistischen Effekt auf Mn^{++} und Mg^{++} ausübt.

Die LAP kann also, wie aus diesen Ergebnissen hervorgeht, durch ihre andersartige Aktivierbarkeit von den LEUNA-spaltenden Enzymen unterschieden werden.

Die von NAKAGAWA u. TSUJI (23), PATTERSON, HSIAO u. KEPPEL (26) und PATTERSON, HSIAO, KEPPEL u. SOROF (27) nachgewiesenen und von der LAP verschiedenen $LeuNH_2$-spaltenden Enzyme werden teils durch Mn^{++} aktiviert, teils durch Mn^{++} gehemmt. Um sie sowohl von der LAP, als auch von den LEUNA-spaltenden Enzymen zu trennen, genügen Aktivierversuche mit Metallionen nicht. Hier bedarf es elektrophoretischer oder chromatographischer Untersuchungen, durch die Enzyme mit verschiedener Ladung, Struktur und verschiedenem Molekulargewicht von einander getrennt werden können.

4. Elektrophoretisches und chromatographisches Verhalten

Durch Elektrophorese konnten WINTERSBERGER u. TUPPY (40) im Normalserum eine einzige, durch Mg^{++} nicht zu beeinflussende LEUNA-aktive Bande erhalten. Die von SPACKMAN, SMITH u. BROWN (35) aus Schweineniere gewonnene LAP zeigte unter Verwendung von Mg^{++} eine etwas langsamer wandernde Bande, die in Abwesenheit von Mg^{++} nur noch sehr schwer nachweisbar war. Eine weitere LEUNA-aktive Bande trat in Seren von Schwangeren auf. Auch sie war von der durch die LAP erzeugten Bande verschieden.

Ebenfalls mehrere LEUNA-aktive Banden konnten PATTERSON, HSIAO, KEPPEL u. SOROF (27) im Cytoplasma von Rattenleber durch Elektrophorese sichtbar machen. Während in Rattenlebercytoplasma gesunder Tiere 3 verschiedene Banden auftraten, erschien eine 4. Bande LEUNA-spaltender Aktivität bei Tieren, die vorher 20 Tage lang mit dem Carcinogen 3-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzol gefüttert worden waren. Demgegenüber erhielten diese Autoren sowohl bei gesunden, als auch bei, mit Carcinogen gefütterten Tieren 2 $LeuNH_2$-spaltende Banden, wovon eine Bande, wenn auch nur wenig, LEUNA-aktiv war.

Durch DEAE-Cellulose-Chromatographie konnten PATTERSON, HSIAO, KEPPEL u. SOROF (27) in Cytoplasma von Rattenleber eine homogene Fraktion $LeuNH_2$-spaltender Aktivität von einer gleichfalls homogenen LEUNA-spaltenden Fraktion trennen.
Im Cytoplasma von Zellen aus Mäuseascitestumoren wiesen PATTERSON, HSIAO u. KEPPEL (26) durch Chromatographie an DEAE-Cellusose je 3 $LeuNH_2$- und LEUNA-aktive Fraktionen nach. Die 1. und 2. LEUNA-spaltende Fraktion fiel in den Bereich der 2. und 3. $LeuNH_2$-aktiven Fraktion. Die Autoren nahmen an, daß die erste $LeuNH_2$-spaltende Fraktion wegen ihres Unvermögens nachweisbar LEUNA zu hydrolysieren auf die LAP zurückzuführen sei. Die beiden ersten LEUNA-aktiven Fraktionen schrieben sie auf Grund ihrer gering ausgeprägten Fähigkeit auch $LeuNH_2$ zu spalten, Peptidasen mit breiterem Hydrolysespektrum zu. Die letzte LEUNA-aktive Fraktion vermochte $LeuNH_2$ überhaupt nicht zu spalten. Es konnten also 3 verschiedene Enzyme voneinander getrennt werden.

O'CONNELL u. WINZLER (25) fanden im Serum von Normalpersonen keine oder nur geringe Hydrolyse von Leucyl-glycin, stets aber deutliche Hydrolyse von LEUNA. In frischem Brustkrebshomogenat wurde dagegen eine starke Leucyl-glycin-Spaltung und eine schwache Spaltung von LEUNA nachgewiesen. Sowohl Normalserum als auch der Extrakt aus Mammacarcinom wurden nun einer DEAE-Cellulose-Chromatographie unterworfen. Während die LEUNA-spaltende Aktivität durch einen einzigen Gipfel in Normalserum und durch mehrere Gipfel in

Extrakt aus Mammacarcinom gut nachzuweisen waren, konnte Leucyl-glycin-Hydrolyse in keiner Fraktion mehr festgestellt werden.

Diese Ergebnisse stehen insofern in Einklang mit denen von KOWLESSAR, HAEFFNER u. SLEISINGER (14), SMITH, PINEDA u. RUTENBURG (35) und WINTERSBERGER u. TUPPY (40), als auch diese Autoren in Normalserum nur eine einzige LEUNA-spaltende Fraktion nachweisen konnten. Während, wie die Ergebnisse von KOWLESSAR, HAEFFNER u. SLEISINGER (14) zeigen, bei Patienten mit Lebererkrankungen eine zusätzliche Fraktion LEUNA-spaltender Aktivität auftritt, berichten SMITH, PINEDA u. RUTENBURG (33) von 3 zusätzlichen LEUNA-aktiven Fraktionen im Serum von Leberkranken. Im Gegensatz zu diesen, durch Elektrophorese gewonnenen Ergebnissen, stehen die von BEHAL, KANAVAGE u. HAMILTON (2), die an DEAE-Cellulose im Normalserum 4 verschiedene LEUNA-aktive Fraktionen voneinander trennten. Bei Verschlußikterus, Cholelithiasis, Lebermetastasen und Pankreascarcinom erfolgt eine Erhöhung aller 4 Fraktionen. Auch SCHOBEL u. WEWALKA (30) wiesen im Normalserum durch Elektrophorese 2 LEUNA-aktive Banden nach. Die erste intensivere Bande stammt aus der Leber und ist möglicherweise mit der einzigen Bande der anderen Autoren (14, 25, 33, 40) identisch.
Doch SCHOBEL u. WEWALKA (29) wiesen nicht nur im Serum, sondern auch im Duodenalsaft und in Homogenat von Duodenalschleimhaut mehrere LEUNA-aktive Fraktionen nach. Im Duodenalsaft ergab die elektrophoretische Trennung der LEUNA-spaltenden Aktivität regelmäßig 2 starke Banden und gelegentlich eine 3. schwache Bande. Die am schnellsten wandernde 1. Bande verändert sich nach Cholecystokiningabe und dürfte aus der Galle stammen. Die 3. Bande stimmt mit einer der beiden aus Homogenat von Duodenalschleimhaut erhaltenen Banden überein und könnte daher aus der Duodenalschleimhaut stammen. Unklar ist noch der Ursprung der mittleren Bande. Ihre Herkunft aus dem Pankreas wird diskutiert. Die vordere, der aus Homogenat von Duodenalschleimhaut erhaltenen Banden, entspricht einer im Serum von Normalpersonen beobachteten schwachen Bande.

Schließlich trennten MAHLER (19) sowie UNBEHAUN, JUNG u. KIDESS (38) in verschiedenen Anteilen vom Schweineovar an DEAE-Sephadex 5 verschiedene LEUNA-aktive Fraktionen chromatographisch voneinander, wobei im Corpus luteum die höchsten Aktivitäten gemessen wurden.

Die Ergebnisse der verschiedenen Autoren variieren nun aber so stark, daß Identitäten einzelner Enzyme nur vermutet werden können. Die Ergebnisse zeigen aber, daß 2 verschiedene Gruppen von Peptidasen vorliegen müssen:
a) Peptidasen, die eine hohe Spezifität gegenüber $LeuNH_2$ aufweisen, und
b) Peptidasen, die eine hohe Spezifität gegenüber den L-Leucyl-arylamiden LEUNA und LEUPA aufweisen.

IV. AMINOSÄUREARYLAMIDASEN (AAA)

DIENSTL (5), sowie NAGEL u. WILLIG (21) schlugen vor, die große Gruppe der LEUNA- bzw. LEUPA-spaltenden Enzyme auf Grund ihres von der LAP abweichenden Verhaltens besonders zu benennen. Sie bezeichneten diese Peptidasen wegen ihrer Fähigkeit die L-Leucyl-arylamide LEUNA und LEUPA, also synthetische Peptide aus einer Aminosäure und einem aromatischen Rest zu spalten, als Aminosäurearylamidasen (AAA). Es soll aber einschränkend darauf hingewiesen werden, daß auch die LAP in geringem Maße L-Leucyl-arylamide zu spalten vermag. Andererseits hydrolysieren auch einige AAA ein wenig $LeuNH_2$ (26). Entsprechend der bekannten und wenig ausgeprägten Substratspezifität der Peptidasen im allgemeinen liegen auch hier Überschneidungen der Substratspektren verschiedener Peptidasen vor.

Neben der von SPACKMAN u.a. (12, 35, 36) genauer untersuchten LAP konnten auch einige AAA näher charakterisiert werden.

1.) SMITH, KAUFMAN u. RUTENBURG (32) konnten aus menschlicher Leber ein teilweise gereinigtes Enzym gewinnen, das wohl LEUNA, aber nicht $LeuNH_2$ zu spalten vermochte. Die Naphthylamide von L-Alanin, L-Methionin und L-Phenylalanin wurden noch rascher als LEUNA umgesetzt. Das Unvermögen dieses Enzyms N-Carboxy-L-Leucyl-β-Naphthylamide zu spalten, zeigt, daß doch eine freie endständige Aminogruppe für die Hydrolyse verantwortlich ist. Die Autoren nannten das Enzym Aminosäurenaphthylamidase.

2.) KRISCH (17) gewann aus Schweinelebermikrosomen eine Esterase, die LEUNA spaltet, aber unfähig ist, $LeuNH_2$ zu hydrolysieren. Dieses Enzym spaltet die Säureamidbindung des Azetamids, die Esterbindung des L-Tyrosinesters und des Procains, sowie einfache aliphatische Ester. Das Enzym ist elektrophoretisch und chromatographisch homogen. Es ist sehr wahrscheinlich identisch mit der Ali-Esterase und Procainase der Leber. KRISCH schlug die Bezeichnung "Mikrosomale Leberesterase" vor.

3.) WOLFF u. RESNIK (41) konnten aus Augenlinsen von Rind, Schwein und Schaf ein Enzym in teilweise gereinigtem Zustand erhalten, dessen Aktivität mit LEUNA gemessen wurde. Es besitzt wohl das Molekulargewicht der LAP, wird aber von Co^{++} aktiviert und weist gegenüber L-Alanyl-glycin und Glycyl-glycin keine Aktivität auf, die von der LAP deutlich gespalten werden.

4.) SYLVEN u. BOIS (37) haben die Hydrolyse von LEUNA an bekannten Pepti-

dasen studiert. Es zeigte sich, daß Prolinase, Chymotrypsin und ein nicht näher identifiziertes Enzym, das zusammen mit Kathepsinpräparaten vorkommt, LEUNA zu spalten vermögen.

5.) WINTERSBERGER u. TUPPY (40) konnten schließlich nachweisen, daß LEUNA ein ausgezeichnetes Substrat für die Oxytocinase ist.

Es zeigte sich somit, daß die AAA eine Gruppe verschiedener und bisher erst teilweise charakterisierter Enzyme umfaßt.

V. METHODIK

1. Zellfraktionierung

a) Herstellung des Gewebehomogenates

Corpora lutea enthaltende Ovarien frisch geschlachteter Schweine wurden sofort eisgekühlt und aufgearbeitet oder spätestens nach 4 Tagen Lagerung bei -16° C verwendet. Die Corpora lutea wurden vorsichtig unter Entfernung der Bindegewebskapsel aus dem Ovar herauspräpariert, mit 0,25 M Rohrzuckerlösung, die auf pH 8 eingestellt war, auf das Fünffache ihres Ausgangsgewichtes aufgefüllt, mit dem Homogenisator nach POTTER und ELVEJHEN homogenisiert und anschließend filtriert.

b) Herstellung der einzelnen Zellfraktionen

Es wurden nach SCHNEIDER (28) je 10 ml Homogenat dreimal 10 Minuten lang bei 600·g in der Zentrifuge geschleudert, wobei jeweils die Überstände nach 10 Minuten dekantiert, und die Sedimente mit 2,5 ml 0,25 M Rohrzuckerlösung resuspendiert wurden. Das zuletzt erhaltene Sediment stellte die Zellkernfraktion dar. Die vereinigten Überstände wurden dann dreimal bei 8 500·g zentrifugiert, wobei die Überstände jeweils dekantiert, und die Sedimente mit 2,5 ml 0,25 M Rohrzuckerlösung resuspendiert wurden. Das zuletzt erhaltene lehmbraune Sediment stellte die Mitochondrienfraktion dar. Die so erhaltenen und vereinigten Überstände wurden dann bei 100 000·g in der Ultrazentrifuge 30 Minuten lang geschleudert. Der klare Überstand stellte die Cytoplasmafraktion dar, während das rotbraune Sediment der Mikrosomenfraktion entsprach.

c) Messung der Aktivitäten

Die Aktivität der AAA (Aminosäurearylamidasen) wurde mit dem Test nach BERNT-BERGMEYER (3), die der LAP mit der Alkoholtitrationsmethode nach GRASSMANN u. HEYDE (9) nachgewiesen.

Test nach BERNT-BERGMEYER (3)

Prinzip der Reaktion:

Das durch die AAA aus LEUNA freigesetzte β-Naphthylamin wird mit dem Diazo-

niumsalz Echtrot 3Gl zu einem roten Farbstoff gekoppelt. Dieser Farbstoff wird mit Essigsäureäthylester ausgeschüttelt und colorimetriert. Die pro Zeiteinheit freigesetzte Menge β-Naphthylamin ist ein Maß für die Enzymaktivität.

Reagentien:

1.) Phosphatpuffer (0,05 M; pH = 7,2). 0,05 K_2HPO_4 und 0,05 KH_2PO_4 wurden unter der Elektrode auf pH = 7,2 eingestellt. Lösung I.
2.) L-Leucyl-β-naphthylamid-hydrochlorid. 15 mg L-Leucyl-β-Naphthylamid-hydrochlorid wurden mit 2,5 ml bidest. Wasser gelöst. Lösung II.
3.) AAA-Reagenz. Lösung II wurde unter kräftigem Rühren in 50 ml Phosphatpuffer gelöst. Lösung III.
4.) Chromogen. Kurz vor einer Bestimmungsserie wurde 20 mg Echtrot 3GL in 20 ml bidest. Wasser gelöst. Lösung IV.
5.) Perchlorsäure (ca. 0,6 M). 5 ml Perchlorsäure wurden mit bidest. Wasser auf 100 ml verdünnt. Lösung V.

Arbeitsweise

Bestimmungsansatz:

Testvolumen: 2,5 ml; Inkubationstemperatur: 37° C; Meßstrahlung: 492 mμ; Schichtdicke: 1 cm.
Zu jeder Versuchsreihe wurde ein Reagentienleerwert ohne Enzymlösung angesetzt, der wie der Hauptwert behandelt wurde. Die Messung erfolgte gegen diesen Leerwert.
In ein 10 ml-Zentrifugenglas wurde nacheinander pipettiert:

2,00 ml AAA-Reagenz (Lösung III)
0,50 ml der jeweiligen Zellfraktion

gemischt und 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Dann wurden

2,50 ml Perchlorsäure (Lösung V)

zugegeben, gemischt und 5 min bei ca. 3000 U/min zentrifugiert.
In je ein 10 ml-Zentrifugenglas wurden pipettiert:

1,00 ml Überstand bzw. Leerwertlösung
1,00 ml Chromogenlösung (Lösung IV)

gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

5,00 ml Essigsäureäthylester

wurden zugegeben, 30 sec. kräftig geschüttelt und bei 3000 U/min kurz zentrifugiert. Die überstehende, rote Lösung wurde mit einer Pipette in eine Küvette gebracht und bei 492 mμ mit dem Photometer EPPENDORF gegen den Leerwert gemessen. Für die gemessene Extinktion wurde die dazugehörige Menge γ β-Naphthylamin aus einer Eichkurve entnommen.

Berechnung der Aktivität:

Die Aktivität wurde in Internationalen Einheiten (I.U.) angegeben. Eine I.U. ist die Enzymmenge, die bei 25° C 1 Mikromol Substr. in 1 min. umsetzt.
Berechnung: Bei 0,5 ml der Zellfraktion in 2,50 ml Testvolumen und einer Verdünnung durch Enteiweißung von 1 : 2 sind die gemessenen µg β-Naphthylamin mit (5x2) = 10 zu multiplizieren. Zur Umrechnung auf I.U./mg Prot. gilt:
Bei einem Molgewicht von 143 für β-Naphthylamin ist 1 µg = 7×10^{-3} µMol;
1 µg/Std ml entsprechen 0,117 µMol/min 1000 ml.
Es ist daher Umsatz von

1,17 µg β-Naphthylamin = 1 m.U.

Die spezifische Aktivität ergibt sich aus Umsatz/Protein.

Titrationsmethode nach GRASSMANN u. HEYDE (31)

Prinzip: Das empfindlichste Substrat für die LAP ist Leucinamid, das hier als Hydrochlorid gegeben wird. Die durch die LAP aus Leucinamid freigesetzten Carboxylgruppen werden bestimmt. Sie können in 90 %igem Äthanol gegen 0,01 n KOH titriert werden.

Reagentien:

1.) Leucinamidhydrochloridlösung (0,125 M)
208 mg der Verbindung wurden in 8,0 ml 0,1 n NaOH gelöst und bis zu 10 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt. Die Verbindung ist, solange Verunreinigungen vermieden werden, vollständig stabil.
2.) 0,2 M Tris-Puffer; pH = 8,0
3.) 0,04 M $MnCl_2$-Lösung
4.) 0,01 M KOH wurden in 90 %igem Äthanol gelöst.
5.) 100 %iger Äthanol
6.) 0,1 %ige Thymolphthaleinlösung wurde in 95 %igem Äthanol gelöst.
7.) Enzym: Die Enzymlösung wurde so verdünnt, daß innerhalb 15 min. 5 bis 15 % des Substrates umgesetzt wurden.

Arbeitsweise

Es wurden nacheinander in ein Reagenzglas pipettiert:

0,5 ml Enzymlösung (der jeweiligen Zellfraktion)
1,0 ml Tris-Puffer
1,0 ml Leucinamid-Lösung

Der Inhalt wurde schnell gemischt. Sofort anschließend und nach einer Stunde

Inkubation im Wasserbad bei 40° C wurden 0,2 ml des Inhalts entnommen, 2 Tropfen Thymolphthalein-Lösung hinzugefügt, gegen 0,01 M alkoholische KOH aus einer Bürette bis zum ersten blauen Endpunkt titriert, 1,8 ml 100 %iger Äthanol hinzupipettiert und bis zum zweiten blauen Endpunkt zu Ende titriert. Die Differenz des Titers zwischen der ersten und der, nach einer Stunde vorgenommenen Bestimmung, ergib die Menge der freigesetzten Carboxylgruppen.

Berechnung der Aktivität:

Die Aktivität wurde in Internationalen Einheiten (I.U.) berechnet. Da die Testlösung 0,05 molar an Leucinamid ist, werden bei 100 % Hydrolyse 50 µMole Leucinamid in 1 ml freigesetzt. Das Testvolumen enthält 0,5 ml Enzymlösung. Es gilt also:

$$\frac{\%\text{ der Hydrolyse}}{\text{mg Prot. x ml 60}} = \frac{\text{I.U.}}{\text{mg Prot. x ml}}$$

Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (18)

Das Protein wird zuerst mit einer alkalischen Kupfersulfatlösung und daraufhin mit dem Phenolreagenz von FOLIN und CIOCALTEU behandelt. Die Methode ist 10 bis 20mal empfindlicher als die UV-Absorbtionsmessung bei 280 mµ und weniger individuellen Schwankungen unterworfen.

Reagentien:

1.) Na_2CO_3; 2 %ig in 0,10 n NaOH (Lösung I)
2.) $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$; 0,5 %ig in 1 %igem Na- oder K-Tartrat (Lösung II)
3.) Alkalische Kupfersulfatlösung: 50 ml von Lösung I wurden mit Lösung II gemischt. Die Lösung (Lösung III) ist nur einen Tag haltbar.
4.) Carbonat-Kupfersulfat-Lösung: Es ist dies die gleiche Lösung wie Lösung III, nur wurde NaOH weggelassen. (Lösung IV)
5.) Verdünntes Phenolreagenz: FOLIN-CIOCALTEU-Phenolreagenz wurde mit NaOH bis zum Phenolphthalein-Endpunkt titriert. Auf der Basis dieser Reaktion wurde das Phenolreagenz solange verdünnt, bis es 1 n an Säure war. (Lösung V)

Eichkurve

Die Rinderalbumin-Standardlösung enthielt 10,4 mg N/ml oder 10,4 x 6,25 = 67,0 mg Prot./ml. Es wurde eine Verdünnungsreihe von 5 verschiedenen, mit bidest. Wasser verdünnten Standardproteinlösungen aufgestellt, wie dies Tabelle 1 zeigt.

Tabelle I

Zahl der Protein-Lösungen	mg Prot. / ml	$E_{578\ m\mu}$
1	0,067	0,083
2	0,270	0,346
3	0,402	0,493
4	0,536	0,654
5	0,670	0,772

Tabelle I zeigt die verschiedenen Verdünnungen der Standardproteinlösung mit den dazugehörigen Extinktionen bei einer Meßstrahlung von 578 mμ gegen einen Leerwert. Die dazugehörige Eichkurve zeigt Abb. 1.

Arbeitsweise

In ein Reagenzglas wurden nacheinander pipettiert:

0,5 ml der Proteinprobe

5,0 ml aus Lösung III

Es wurde gemischt und 10 min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

0,5 ml aus Lösung V

wurden dazugegeben, rasch gemischt, 30 min. bei Zimmertemperatur stehengelassen und im Photometer EPPENDORF bei einer Meßstrahlung von 578 mμ die Extinktion gegen einen Leerwert abgelesen. Bei der Bestimmung des Leerwertes wurde genau wie bei der Bestimmung der Hauptwerte vorgegangen, nur daß die 0,5 ml der Proteinprobe durch 0,5 ml bidest. Wasser ersetzt wurden.
Bei der Proteinbestimmung der Proben mit unbekanntem Proteingehalt wurde genau so vorgegangen wie bei der Bestimmung der Eichkurve. Diese Proben wurden so verdünnt, daß ihre Extinktionen in den Bereich der Linearität der Eichkurve fielen.

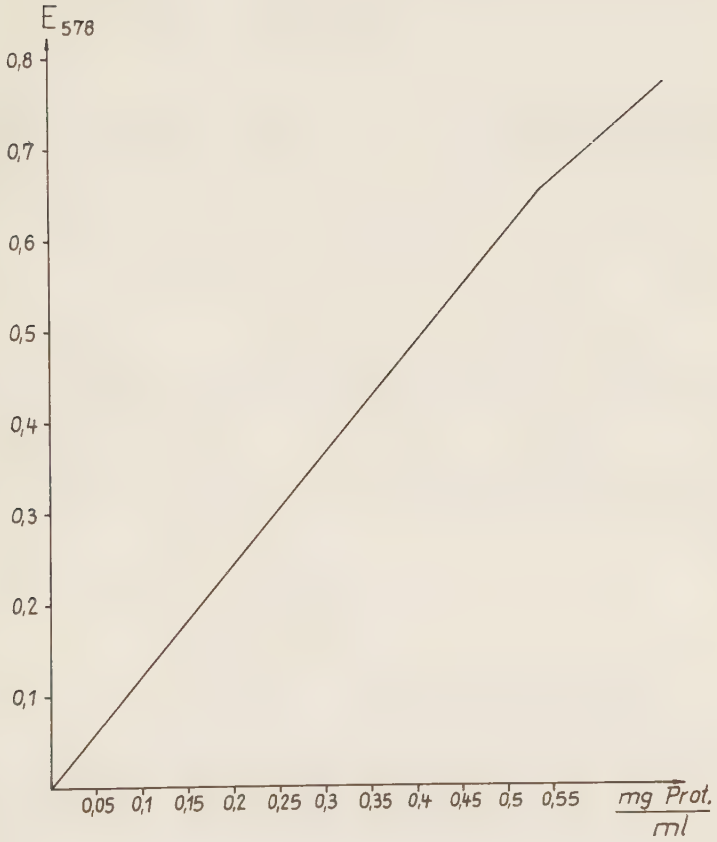


Abb. 1 zeigt die Eichkurve für die Proteinbestimmung

2. Reinigungsschritte

Frisch gewonnenes Homogenat wurde auf der Kühlzentrifuge 30 Minuten mit 100000 · g geschleudert. Die überstehende klare Flüssigkeit entsprach der Cytoplasmafraktion. Die weiteren Versuche wurden in der Cytoplasmafraktion vorgenommen, da, wie die Ergebnisse zeigten, in dieser Zellfraktion die höchsten LEUNA-spaltenden Aktivitäten gemessen wurden. Ein Teil des Cytoplasmas wurde unverändert für die weiteren Versuche belassen; der Rest wurde säulenchromatographisch an Sephadex G-25 von Molekülen gereinigt, deren Molekulargewichte unter 5000 lagen. Ein Teil des an Sephadex G-25 gereinigten Cytoplasmas wurde wieder unverändert für die weiteren Versuche bereitgestellt; der Rest wurde durch die kombinierte Zink-Hitze-Behandlung nach HANSON, GLÄSSER u. KIRSCHKE (12) einer weiteren Reinigung unterworfen:

In ein 10 ml-Zentrifugenglas wurden nacheinander pipettiert:

10 ml säulenchromatographisch gereinigter Überstand
0,06 ml 1 molare $ZnSO_4$-Lösung

Dabei wurde ständig mit einem Glasstab gerührt. Der so erhaltene Überstand ist 0,006 molar an $ZnSO_4$. Das gefällte Protein wurde abzentrifugiert und der Überstand 10 bis 15 Minuten in einem auf 40° C eingestellten Wasserbad erhitzt. Die dadurch aufgetretene Flockung wurde mit einem Faltenfilter entfernt. Der nun hochgereinigte Überstand wurde für die weiteren Versuche bereitgestellt.

3. Aktivierung und Hemmung der Aktivitäten an rohen und gereinigten Extrakten

Zur Aktivierung wurde das Enzym mit 0,04 molarer $MnCl_2$-Lösung, zur Hemmung mit 0,1 molarer EDTA-Lösung präinkubiert, wobei zu jeder mit $MnCl_2$ oder EDTA präinkubierten Versuchsreihe zum Vergleich eine zweite, ebenso behandelte Versuchsreihe angesetzt wurde, bei der die Effektoren aber durch bidest. Wasser ersetzt waren.

Es wurden nacheinander in ein Reagenzglas pipettiert:

1 ml Enzymlösung
1 ml Tris-Puffer pH 8,0
0,5 ml 0,04 M $MnCl_2$ bzw. 0,1 M EDTA

Der Inhalt wurde kurz geschüttelt, zur optimalen Aktivierung bzw. Hemmung des Enzyms 60 Minuten bei 40° C im Wasserbad bebrütet und anschließend sofort der Aktivitätsbestimmung zugeführt.

Messung der Aktivitäten

Die Aktivitäten der Aminosäurearylamidasen (AAA) wurden mit dem Farbtest Art. Nr. 15952 der Firma C.F. BOEHRINGER & SOFHNE GMBH, MANNHEIM, nachgewiesen. Die Aktivitäten der LAP wurden durch die Alkoholtitrationsmethode nach GRASSMANN u. HEYDE gemessen.

Farbtest Art. Nr. 15 952 der Firma C.F. BOEHRINGER & SOEHNE GMBH, MANNHEIM

Prinzip der Reaktion:

Reagentien:

1.) Lösung I: 0,05 M Phosphatpuffer pH = 7,2. Diese Lösung ist bei ca. + 4° C ein Jahr haltbar.
2.) Lösung II: 0,01 M Leucin-p-nitroanilid. Diese Lösung ist bei ca. + 4° C sechs Monate haltbar.

Arbeitsweise:

Wellenlänge der Meßstrahlung: 405 mμ, Glas-Küvette: 1 cm Schichtdicke, Temperatur: 25° C, Messung gegen Luft.

In ein Reagenzglas wurden nacheinander pipettiert:

3,00 ml Lösung I
0,10 ml oder 0,50 ml Lösung II

Es wurde gemischt und 5 Minuten im Wasserbad stehengelassen.

0,50 ml oder 0,10 ml präinkubierte Enzymlösung wurden hinzupipettiert. Es wurde gemischt, der Inhalt in eine Glas-Küvette gegossen, die Extinktion E_1 gemessen, bei 25° C 30 min. im Wasserbad stehen gelassen, E_2 gemessen, und aus dem Extinktionszuwachs $\Delta E = E_2 - E_1$ bestimmt.

Berechnung der Aktivität:

Für Enzymlösungen ohne eine vorherige Verdünnung durch Präinkubation gilt:

$$\frac{\Delta E \times 108}{\text{mg Prot.}} = \text{m.U./mg Prot.}$$

Da durch Präinkubation eine Verdünnung um den Faktor 2,5 bzw. 0,5 erfolgte gilt:

$$\frac{\Delta E \times 108 \times 2,5}{\text{mg Prot.}} = \frac{\Delta E \times 270}{\text{mg Prot.}} = \text{m.U./mg Prot.}$$

bzw.

$$\frac{\Delta E \times 108 \times 0,5}{\text{mg Prot.}} = \frac{\Delta E \times 54}{\text{mg Prot.}} = \text{m.U./mg Prot.}$$

Titrationsmethode nach GRASSMANN u. HEYDE (9)

Sie wurde wie oben beschrieben ausgeführt. Da aber an Stelle von 0,5 ml unverdünnter Enzymlösung 0,5 ml bzw. 1,0 ml präinkubierte Enzymlösung verwendet wurde, ergibt sich aus dieser Verdünnung eine etwas andere Berechnung der Aktivitäten.

Berechnung der Aktivität:

Entsprechend einer Verdünnung durch Präinkubation um den Faktor 5 bzw. 2,5 gilt:

$$\frac{\%\text{ der Hydrolyse} \times 5}{\text{mg Prot.} \times 60} = \frac{\%\text{ der Hydrolyse}}{\text{mg Prot.} \times 12} = \text{I.U./mg Prot.}$$

bzw.

$$\frac{\%\text{ der Hydrolyse} \times 2,5}{\text{mg Prot.} \times 60} = \frac{\%\text{ der Hydrolyse}}{\text{mg Prot.} \times 24} = \text{I.U./mg Prot.}$$

4. Säulenchromatographische Auftrennung der Enzymaktivitäten an DEAE Sephadex A-50

An Sephadex G-25 vorgereinigter und durch kombinierte Zink-Hitze-Behandlung hochgereinigter Extrakt wurde getrennt an DEAE-Sephadex A-50 (Deutsche Pharmacia, Frankfurt/M.) der Säulenchromatographie unterworfen.

Arbeitsweise:

3 g DEAE Sephadex A-50-Gel wurden mit 1 Liter Tris-Puffer (pH = 8) suspendiert, 24 Stunden äquilibriert und nach mehrmaligem Abgießen der oberflächlichen Gelkörner in einem Chromatographierohr von 0,9 cm Durchmesser zu einem Gelbett von 15 cm Höhe sedimentiert. Die Säule wurde durch einen Kühlmantel mit Leitungswasser gekühlt. Es wurden vorsichtig 10 ml des jewei-

ligen Extraktes auf das Gelbett pipettiert und stufenweise eluiert:

I 60 ml 0,1 M Tris-Puffer (pH = 8)
II 50 ml 0,05 M NaCl in 0,1 M Tris-Puffer
III 50 ml 0,10 M NaCl in 0,1 M Tris-Puffer
IV 50 ml 0,20 M NaCl in 0,1 M Tris-Puffer
V 50 ml 0,50 M NaCl in 0,1 M Tris-Puffer

Die Fraktionen wurden in einem Fraktionensammler (LKB-Radi Rac Fraction Collector Type 3402 B) zu jeweils 5 ml aufgefangen, sofort gekühlt, und die Proteinbestimmung durchgeführt. Aus den einzelnen Fraktionen wurden jeweils 0,5 ml zur Bestimmung der Aktivität der Aminosäurearylamidasen entnommen, die, wie oben beschrieben und ohne vorherige Präinkubation durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Fraktionen nach Zusatz von 1 ml 0,04 M $MnCl_2$ 1 Stunde lang bei 40° C im Wasserbad präinkubiert.

In ein Reagenzglas wurden nacheinander pipettiert:

1,0 ml der präinkubierten Fraktion
0,5 ml 0,2 M Tris-Puffer (pH = 8)
1,0 ml Substrat

Es wurde gemischt und die Aktivität der LAP wie oben beschrieben bestimmt.

VI. ERGEBNISSE

1. Zellfraktionierung

Um einen Überblick über die Verteilung der $LeuNH_2$- und der L-Leucyl-arylamide-spaltenden Aktivität in der Zelle vom Corpus luteum zu gewinnen, wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt, und anschließend die Aktivitätsbestimmung vorgenommen

a) $LeuNH_2$-spaltende Aktivität

Wie Tab. II und Abb. 2 zeigen, weist das Cytoplasma eine sehr hohe spezifische Aktivität auf. Die Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion enthält jeweils nur etwa 50 % der spezifischen Aktivität der Cytoplasmafraktion. Im Homogenat und in der Zellkernfraktion ist mit etwa 25 % der spezifischen Aktivität des Cytoplasmas am wenigsten Aktivität enthalten.

Tabelle II

	1. Untersuchung		2. Untersuchung	
Zellfraktion	Hydrolyse in %	m.U. mg Prot.	Hydrolyse in %	m.U. mg Prot.
Homogenat	45,4	23,4	85,0	46,8
Cytoplasma	63,2	222,0	100,0	252,0
Zellkerne	40,1	42,0	78,1	75,0
Mitochondrien	99,4	164,0	78,4	114,2
Mikrosomen	100,0	88,0	79,5	117,0

	3. Untersuchung		Mittelwert
Zellfraktion	Hydrolyse in %	m.U. mg Prot.	m.U. mg Prot.
Homogenat	100,0	59,0	43,0
Cytoplasma	82,1	165,0	213,0
Zellkerne	48,6	33,4	50,1
Mitochondrien	68,6	73,0	117,0
Mikrosomen	63,4	86,2	97,1

Tab. II zeigt die Verteilung der spezifischen Aktivität der $LeuNH_2$-spaltenden Enzyme auf die einzelnen Fraktionen der Zelle vom Curpus luteum.

b) LEUNA-spaltende Aktivität

Wie Tab. III und Abb. 2 zeigen, weist die Mitochondrienfraktion die höchste spezifische Aktivität auf. Die spezifischen Aktivitäten der anderen Zellfraktionen sind viel geringer und liegen zwischen 25 % und 50 % der spezifischen Aktivität der Mitochondrienfraktion.

Tabelle III

	1. Untersuchung		2. Untersuchung		Mittelwert
Zellfraktion	$E_{492\,m\mu}$	$\frac{m.U.}{mg\ Prot.}$	$E_{492\,m\mu}$	$\frac{m.U.}{mg\ Prot.}$	$\frac{m.U.}{mg\ Prot.}$
Homogenat	1,231	7,38	0,841	4,1	5,74
Cytoplasma	0,282	9,82	0,160	2,97	6,4
Zellkerne	0,705	10,12	0,712	5,97	8,04
Mitochondrien	0,84	20,9	0,911	18,8	19,8
Mikrosomen	0,749	5,47	0,512	7,32	6,37

Tab. III zeigt die Verteilung der spezifischen Aktivität der LEUNA-spaltenden Enzyme auf die einzelnen Fraktionen der Zelle vom Corpus luteum.

Ein Vergleich der $LeuNH_2$-spaltenden mit der LEUNA-spaltenden Aktivität zeigt:

1.) Die spezifische Aktivität der $LeuNH_2$-spaltenden Enzyme ist etwa 5 bis 350 mal höher als die der LEUNA-spaltenden Enzyme.
2.) Die spezifische Aktivität der $LeuNH_2$-spaltenden Enzyme ist vorwiegend in der Cytoplasmafraktion, die der LEUNA-spaltenden Enzyme dagegen vorwiegend in der Mitochondrienfraktion lokalisiert.

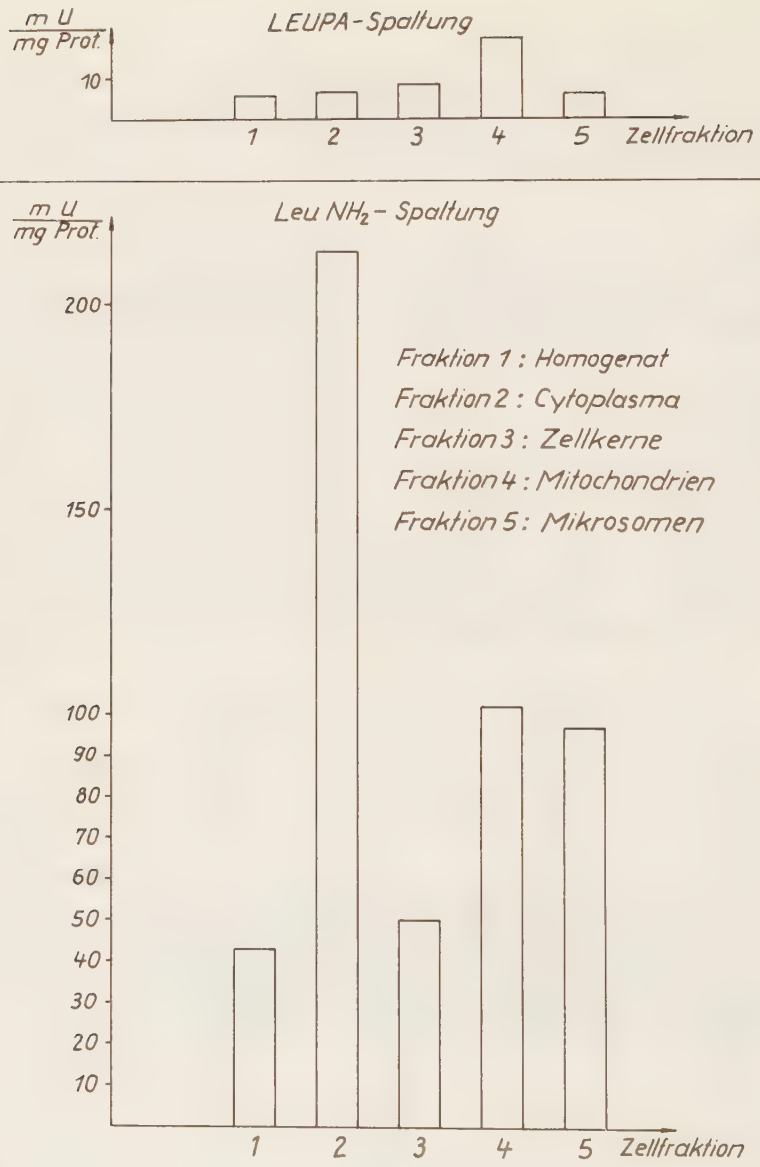


Abb. 2 zeigt die Verteilung der spezifischen Aktivitäten sowohl der $LeuNH_2$- als auch der LEUNA-Spaltung auf die verschiedenen Fraktionen der Zelle vom Corpus luteum.

2. Trennung der $LeuNH_2$-spaltenden von der L-Leucyl-arylamid-spaltenden Aktivität mit Hilfe der kombinierten Zink-Hitze-Behandlung des Extraktes

Die folgenden Versuche wurden mit Cytoplasma durchgeführt, da, wie durch die Zellfraktionierung gezeigt werden konnte, in dieser Zellfraktion die $LeuNH_2$-Spaltung besonders ausgeprägt ist. Diese Spaltung von $LeuNH_2$ kann, wie oben ausgeführt wurde, mit Einschränkung auf die LAP zurückgeführt werden. Auch MAHLER (19) verwandte für seine Versuche Cytoplasma. Die Verwendung von Cytoplasma für die folgenden Versuche bietet somit den Vorteil, die Ergebnisse mit denen von MAHLER (19) vergleichen zu können.

Es wurden die $LeuNH_2$-spaltende und L-Leucyl-arylamid-spaltende Aktivität sowohl im Sephadex G-25-gereinigten als auch im Zink-Hitze-behandelten und somit hochgereinigten Extrakt gemessen und einander gegenübergestellt. Die Veränderung des Verhältnisses L-Leucyl-arylamid-spaltende Aktivität/ $LeuNH_2$-spaltende Aktivität durch den Reinigungsschritt der Zink-Hitze-Behandlung zeigt eine Verschiebung der beiden Aktivitäten durch diesen Reinigungsschritt an. Handelt es sich um ein einheitliches Enzym, dessen Aktivität durch beide Tests bestimmt wird, so müßte sich das Verhältnis der durch diese Tests bestimmten Aktivitäten durch den Reinigungsschritt nicht verändern. Eine Änderung dieses Verhältnisses deutet auf eine Heterogenität des Enzyms hin, da in diesem Fall eine Enzymkomponente durch den Reinigungsschritt stärker ausgefällt oder angereichert worden ist. Der Quotient aus den beiden Verhältniswerten $LeuNH_2$-spaltende Aktivität/L-Leucyl-arylamid-spaltende Aktivität vor und nach dem Reinigungsschritt entspricht dem Ausmaß der Verschiebung der Enzymkomponenten durch den Reinigungsschritt. Da durch diesen Quotient die Heterogenität des Enzyms ausgedrückt wird, wurde dieser aus den Meßwerten gebildet und als Heterogenitätsquotient bezeichnet. Er gibt an, um das wievielfache die Aktivität der einen Enzymkomponente gegenüber der anderen Enzymkomponente durch den Reinigungsschritt verändert wurde. Bei einem einheitlichen Enzym würde der Heterogenitätsquotient 1 betragen.

Tab. IV zeigt die Ergebnisse der 1. Untersuchung dieser Versuchsreihe und gibt die Veränderungen durch den Reinigungsschritt wieder.

Tabelle IV

1. Untersuchung	Sephadex G-25-gereinigter Extrakt			Zink-Hitze-gereinigter Extrakt		
Art der Aktivität	mg Prot. / ml	E bzw. Hydrol. in %	m.U. / mg Prot.	mg Prot. / ml	E bzw. Hydrol. in %	m.U. / mg Prot.
LEUPA-spalt. Aktivität	7,8	1,53	10,62	2,05	0,027	0,72
$LeuNH_2$-spalt. Akt.	7,8	39,0	100,4	2,05	24,0	203,6

Wie aus Tab. IV hervorgeht, beträgt das Verhältnis der spezifischen Aktivität der beiden Enzymkomponenten

1.) vor der Reinigung des Extraktes:

$$\frac{\text{LeuNH}_2\text{-spaltende Aktivität}}{\text{LEUPA-spaltende Aktivität}} = \frac{100,4}{10,62} = 9,8$$

2.) nach der Reinigung des Extraktes:

$$\frac{\text{LeuNH}_2\text{-spaltende Aktivität}}{\text{LEUPA-spaltende Aktivität}} = \frac{203,6}{0,724} = 282,0$$

Daraus ergibt sich ein Heterogenitätsquotient von:

$$\frac{282,0}{9,8} = 28,8$$

Wie Tab. IV zeigt, beträgt die spezifische Aktivität der L-Leucyl-arylamid-spaltenden Enzyme, die hier mit LEUPA nachgewiesen wurde, vor dem Reinigungsschritt 10,62 m.U./mg Protein. Im hochgereinigten Extrakt vermindert sich diese Aktivität auf 0,74 m.U./mg Protein. Sie beträgt also nur noch etwa den 14. Teil der ursprünglichen Aktivität. Es wurde die LEUPA-spaltende Aktivität durch diesen Reinigungsschritt somit deutlich eliminiert. Demgegenüber erhöhte sich die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität von 100,4 m.U./mg Protein im Sephadex G-25-gereinigten Extrakt auf 203,6 m.U./mg Protein im hochgereinigten Extrakt. Es erfolgte also etwa eine Verdoppelung dieser Enzymaktivität. Setzt man nun die spezifischen Aktivitäten der $LeuNH_2$-spaltenden Enzyme zu

denen der LEUPA-spaltenden Enzyme in Beziehung, so zeigt sich eine Veränderung dieses Verhältnisses von 9,8 auf 282,0 durch den Reinigungsschritt. Dies bedeutet eine Anreicherung der $LeuNH_2$-spaltenden Aktivität um das 28,8-fache gegenüber der LEUPA-spaltenden Aktivität. Dabei muß berücksichtigt werden, daß $LeuNH_2$-spaltende Enzyme, von denen die LAP infolge ihrer hohen Spaltungsraten an $LeuNH_2$ am bedeutsamsten ist, auch etwas LEUPA zu spalten vermögen. Es muß also in jedem Falle, auch bei einer vollständigen Eliminierung der L-Leucyl-arylamid-spaltenden Enzyme durch den Reinigungsschritt, mit LEUPA als Substrat noch eine Aktivität nachweisbar sein. Der Heterogenitätsquotient ist somit kleiner als dem Ausmaß der Eliminierung der L-Leucyl-arylamid-spaltenden Enzyme entspricht.

Tab. V gibt die Ergebnisse aller Versuche und die Veränderungen der Aktivitäten durch den Reinigungsschritt wieder.

Tabelle V

Zahl der Untersuchungen	1	2	3	4	5
spez. Aktivität der LEUPA-spaltenden Enzyme					
a) Sephadex G-25 gereinigter Extrakt	5,15	10,62	17,3	10,95	5,23
b) Zink-Hitze gereinigter Extrakt	6,59	0,72	3,4	0,28	1,15
spez. Aktivität der $LeuNH_2$-spaltenden Enzyme					
a) Sephadex G-25-gereinigter Extrakt	85,7	100,4	138,5	290,9	126,8
b) Zink-Hitze gereinigter Extrakt	432,0	203,6	123,6	553,4	267,9
spez. $LeuNH_2$-spaltende Aktivität/spez. LEUPA-spaltende Aktivität					
a) Sephadex G-25-gereinigter Extrakt	16,7	9,8	8,0	27,0	24,1
b) Zink-Hitze gereinigter Extrakt	65,8	282,0	36,4	1975,0	232,3
Heterogenitätsquotient	4,6	28,8	4,52	73,2	9,65
Der mittlere Heterogenitätsquotient beträgt					24,1

Wie Tab. V zeigt, wurde mit einem mittleren Heterogenitätsquotient von 24,1, die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität gegenüber der L-Leucyl-arylamid-spal-

tenden Aktivität durchschnittlich etwa um das 24-fache angereichert. Der Heterogenitätsquotient ist in jedem Falle größer als 1. Durch den Reinigungsschritt der kombinierten Zink-Hitze-Behandlung wurde die L-Leucyl-arylamid-spaltende Aktivität eliminiert, die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität dagegen angereichert. Dieses Ergebnis zeigt, daß die im Cytoplasma aus dem Corpus luteum vom Schwein mit den Substraten $LeuNH_2$ und LEUPA bestimmte Aktivität nicht auf ein einheitliches Enzym zurückzuführen ist.

3. Beeinflussung der Enzymaktivität durch Mn^{++}-Ionen

Unbehandeltes, Sephadex-G-25-gereinigtes und, durch Zink-Hitze-Behandlung hochgereinigtes Cytoplasma wurde nach Zusatz von Mn^{++}-Ionen getestet. Um das Ausmaß der Aktivierung oder Hemmung durch Mangan in % berechnen zu können, wurden die Aktivitäten der Proben, die ohne Manganzusatz mitgeführt wurden, als Basiswerte zu 100 % angenommen.

a) rohes Cytoplasma

Wie aus Tab. VI und VII sowie aus Abb. 3 hervorgeht, vermag Mangan in rohen Extrakten nur die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität, also vor allem die LAP zu aktivieren. Die Aktivierung beträgt 26,7 %. Die LEUPA-spaltende Aktivität wird dagegen kaum beeinflußt.

Tab. VI zeigt die Wirkung von Mangan auf die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität in rohem Cytoplasma.

Tabelle VI

Zahl der Untersuchungen:	mit Mn^{++} getestet		ohne Mn^{++} getestet
	m.U./mg Prot.	Aktivierung (%)	m.U./mg Prot. (100 %)
1	35,0	152,1	23,5
2	140,1	113,9	123,0
3	73,7	105,8	69,5
4	48,2	195,0	24,6
5	59,7	119,0	51,3
6	53,1	93,4	56,9
7	60,2	106,1	56,7
8	178,3	128,6	138,5
Mittelwerte	80,9	126,7	67,8
Standard-Abw.	52,1	32,7	42,1

b) Sephadex G-25-gereinigtes Cytoplasma

Wie aus Tab. VIII und IX sowie aus Abb. 3 hervorgeht, vermag Mangan in Extrakten, die an Sephadex G-25 coarse von Molekülen mit Molekulargewichten bis 5000 gereinigt worden sind, die $LeuNH_2$-spaltenden Enzyme um 23,5 %, also etwa im selben Ausmaß zu aktivieren wie im rohen Cytoplasma. Die LEUPA-spaltende Aktivität wird dagegen hier um 57,5 % gehemmt.

Tab. VII zeigt die Wirkung von Mangan auf die LEUPA-spaltende Aktivität in rohem Cytoplasma.

Tabelle VII

Zahl der Untersuchungen	Mit Mn^{++} getestet		ohne Mn^{++} getestet
	m.U./mg Prot.	Aktivierung (%)	m.U./mg Prot. (100 %)
1	1,742	106,4	1,637
2	4,808	120,0	4,006
3	4,240	86,2	4,913
4	2,742	142,0	1,935
5	10,605	61,6	17,294
Mittelwerte	4,827	103,3	5,957
Standard-Abw.	3,44	31,6	6,5

Tabelle VIII zeigt die Wirkung von Mangan auf die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität in Sephadex G-25-gereinigtem Extrakt.

Tabelle VIII

Zahl der Untersuchungen	Mit Mn^{++} getestet		ohne Mn^{++} getestet
	m.U./mg Prot.	Aktivierung (%)	m.U./mg Prot. (100 %)
1	57,5	134,0	42,5
2	118,2	197,5	59,7
3	47,8	85,5	56,0
4	313,7	108,0	290,9
5	126,8	100,0	126,8
Mittelwerte	132,8	123,5	115,2
Standard-Abw.	107,2	44,1	103,5

Tab. IX zeigt die Wirkung von Mangan auf die LEUPA-spaltende Aktivität in Sephadex G-25-gereinigtem Extrakt.

Tabelle IX

Zahl der Untersuchungen	Mit Mn^{++} getestet		ohne Mn^{++} getestet
	m.U./mg Prot.	Aktivierung (%)	m.U./mg Prot. (100 %)
1	0,334	6,3	5,310
2	1,500	28,3	5,310
3	4,510	41,4	10,950
4	4,655	75,8	6,136
5	3,182	60,7	5,234
Mittelwerte	2,836	42,5	6,548
Standard-Abw.	1,89	27,18	2,46

c) Zink-Hitze-behandelter, hochgereinigter Extrakt

Wie aus Tab. X und XI sowie Abb. 3 hervorgeht, wird in Extrakten, die durch kombinierte Zink-Hitze-Behandlung von etwa 75 % der ursprünglichen Proteine befreit wurden, sowohl die $LeuNH_2$-spaltende als auch die LEUPA-spaltende Aktivität sehr stark durch Mangan aktiviert. Die Aktivierung beträgt bei der $LeuNH_2$-spaltenten Aktivität 105,3 %, bei der LEUPA-spaltenden Aktivität 104,3 %.

Tab. X zeigt die Wirkung von Mangan auf die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität im Zink-Hitze-behandelten Extrakt.

Tabelle X

Zahl der Untersuchungen	Mit Mn^{++} getestet		ohne Mn^{++} getestet
	m.U./mg Prot.	Aktivierung (%)	m.U./mg Prot. (100 %)
1	340,3	530,0	64,4
2	522,5	121,2	432,0
3	310,9	153,3	203,6
4	175,2	141,8	123,6
5	689,2	124,2	553,4
6	431,0	161,3	267,9
Mittelwerte	411,5	205,3	274,1
Standard-Abw.	148,9	179,7	186,9

Tab. XI zeigt die Wirkung von Mangan auf die LEUPA-spaltende Aktivität im Zink-Hitze-behandelten Extrakt.

Tabelle XI

Zahl der Untersuchungen	Mit Mn^{++} getestet		ohne Mn^{++} getestet
	m.U./mg Prot.	Aktivierung (%)	m.U./mg Prot. (100 %)
1	0,251	92,8	0,279
2	2,686	373,0	0,724
3	5,311	155,6	3,405
4	0,782	280,2	0,279
5	2,620	142,3	1,840
6	2,088	182,0	1,152
Mittelwerte	2,290	204,3	1,282
Standard-Abw.	1,78	101,4	1,20

Abb. 3 zeigt die Wirkung von Mangan sowohl auf die $LeuNH_2$- als auch auf die LEUPA-spaltende Aktivität bei fortschreitender Reinigung der Extrakte

Abb. 3

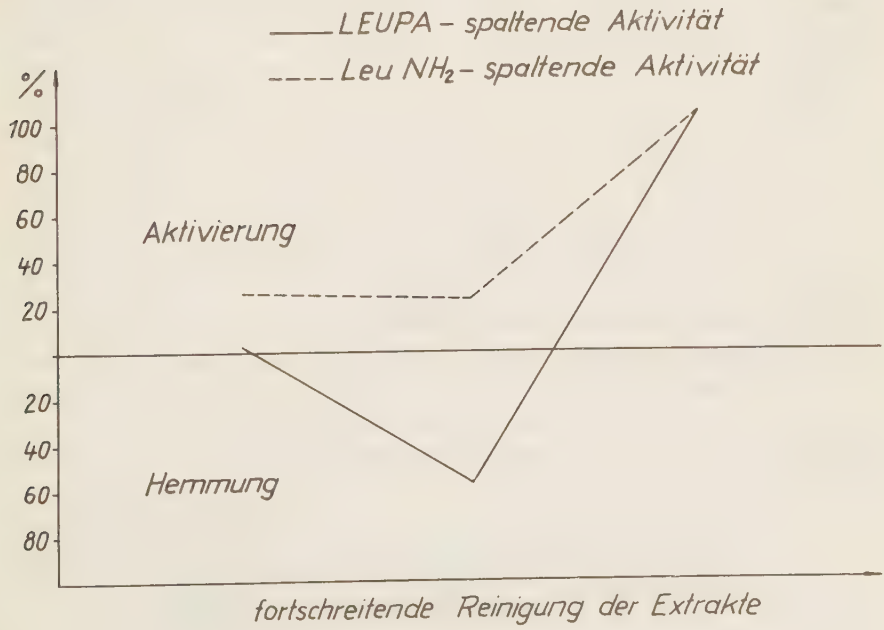
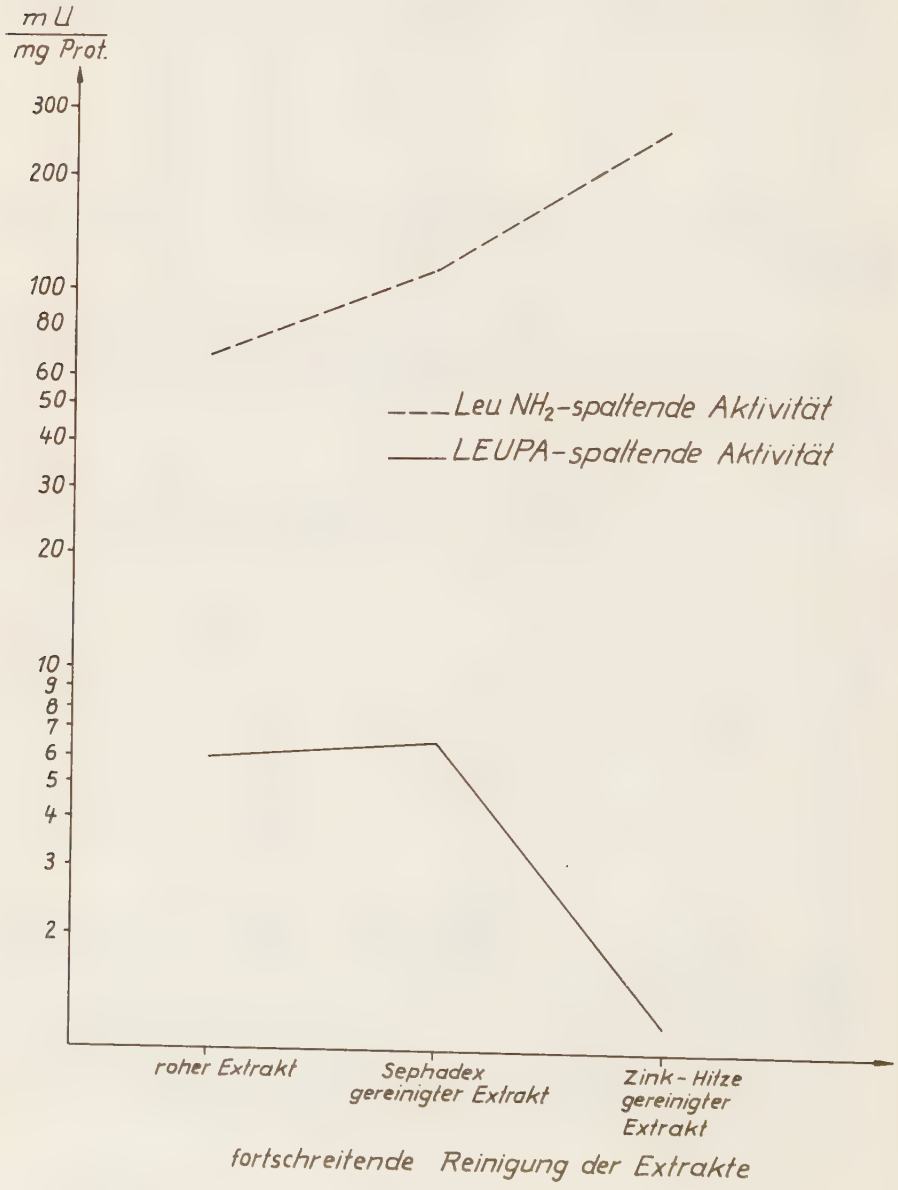


Abb. 4 zeigt die spezifische Aktivität der $LeuNH_2$- und LEUPA- spaltenden Enzyme bei fortschreitender Reinigung der Extrakte.

Abb. 4



Durch die Ergebnisse dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, daß Mangan die $LeuNH_2$-spaltenden Enzyme in jedem Falle aktiviert, wobei die Aktivierung in hochgereinigten Extrakten stärker ausgeprägt ist als in rohen oder Sephadex-G-25-gereinigten Extrakten. Demgegenüber werden die LEUPA-spaltenden Enzyme je nach Reinigungsstufe kaum beeinflußt, gehemmt oder aktiviert. In hochgereinigten Extrakten ist die Wirkung von Mangan auf beide Enzymaktivitäten dieselbe. Mangan vermag hier beide Enzymgruppen sehr stark zu aktivieren.

Aus Tab. VI bis XI geht darüberhinaus hervor, daß, wie dies durch Abb. 4 veranschaulicht wird, die spezifische Aktivität der $LeuNH_2$-spaltenden Enzyme etwa 10 bis 200 mal höher als die der LEUPA-spaltenden Enzyme ist. Außerdem zeigt sich, daß die Differenz zwischen den beiden Enzymaktivitäten mit steigender Reinheit der Extrakte zunimmt. Die spezifische Aktivität im Sephadex G-25-gereinigten Extrakt hat gegenüber der im rohen Extrakt bei beiden Enzymgruppen zugenommen, doch ist die Zunahme bei der $LeuNH_2$-spaltenden Aktivität um ein Vielfaches größer als bei der LEUPA-spaltenden Aktivität. Die spezifische Aktivität der $LeuNH_2$-spaltenden Enzyme erfährt nach der kombinierten Zink-Hitze-Behandlung einen sehr starken Anstieg, während die der LEUPA-spaltenden Enzyme danach stark abfällt. Dies deutet wieder darauf hin, daß, wie dies schon oben beschrieben wurde, durch die Reinigung der Extrakte, insbesondere durch die kombinierte Zink-Hitze-Behandlung, die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität in den Extrakten angereichert, die LEUPA-spaltende Aktivität aber aus ihnen entfernt wird.

4. Hemmung der Enzymaktivität durch EDTA

EDTA (Äthylendiamintetraacetat) bindet als Chelatbildner die zur Aktivierung der Enzyme notwendigen Metallionen. Unbehandeltes und Sephadex G-25-gereinigtes Cytoplasma wurde nach Zusatz von 0,1 M EDTA getestet. Um das Ausmaß der Hemmung durch EDTA in % berechnen zu können, wurden die Aktivitäten der Proben, die ohne EDTA-Zusatz mitgeführt wurden, als Basiswerte zu 100 % angenommen.
Tab. XII zeigt die Wirkung von EDTA auf die $LeuNH_2$- und LEUPA-spaltende Aktivität in rohem und Sephadex G-25-gereinigtem Extrakt.

Tabelle XII

Zahl der Untersuchungen	Mit EDTA getestet		ohne EDTA getestet
	m.U./mg Prot.	restl. Aktivität in %	m.U./mg Prot. (100 %)
$LeuNH_2$-spalt. Aktivität:			
roher Extrakt			
1	-	0	9,8
2	-	0	26,0
gerein. Extrakt			
1	7,9	13,2	59,7
2	23,4	25,0	93,7
LEUPA-spalt. Aktivität:			
roher Extrakt			
1	0,67	24,4	2,74
2	0,64	23,6	2,72
gerein. Extrakt			
1	0,96	18,0	5,31
2	1,00	19,2	5,24

Während EDTA die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität in rohem Extrakt vollständig beseitigt, wird sie im Sephadex G-25-gereinigten Extrakt um 80,9 % gehemmt. Die LEUPA-spaltende Aktivität wird im rohen Extrakt durch EDTA um 76 %, im Sepahdex G-25-gereinigten Extrakt um 81,4 % gehemmt. EDTA hemmt also in rohem Extrakt die $LeuNH_2$-Hydrolyse mehr als die LEUPA-Hydrolyse. In gereinigtem Extrakt werden beide Enzymaktivitäten durch EDTA etwa gleich stark gehemmt.

5. Inaktivierung der Enzymaktivität durch Einfrieren, Lagerung und Auftauen

Frisches, unmittelbar aus der Ultrazentrifuge kommendes Cytoplasma, wurde auf $LeuNH_2$- und LEUPA-spaltende Aktvität hin getestet. Danach wurde der Extrakt sofort auf -17^{o} C eingefroren, nach 6 Tagen Lagerung bei dieser Temperatur wieder aufgetaut und erneut auf $LeuNH_2$- und LEUPA-spaltende Aktivität hin untersucht.

Tab. XIII zeigt, daß nach 6 Tagen noch eine restliche $LeuNH_2$-Hydrolyse von etwa 40 % vorhanden ist. Die LEUPA-Spaltung beträgt dagegen nach dieser Zeit nur noch etwa 25,0 % der ursprünglichen Aktivität. Die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität erwies sich nach diesen Versuchen somit als stabiler.

Tab. XIII zeigt die spezifische Aktivität der $LeuNH_2$- und der LEUPA-Spaltung am Anfang und Ende eines sechstägigen Intervalls, währenddessen der Extrakt bei -17° C gelagert war.

Tabelle XIII

Zahl der Versuche	$LeuNH_2$-spalt. m.U./mg Prot.	Aktivität %	LEUPA-spalt. m.U./mg Prot.	Aktivität %
1. Tag				
1	252	100	7,0	100
2	246	100	6,8	100
6. Tag				
1	96	38,1	1,7	24,4
2	102	41,5	1,9	26,2
mittlere restl. Aktivität:		39,8		25,3

6. Säulenchromatographische Untersuchungen

Durch säulenchromatographische Auftrennung an DEAE Sephadex A-50 vor und nach dem Reinigungsschritt der kombinierten Zink-Hitze-Behandlung des Cytoplasmas wurde versucht, einen Überblick über die eliminierten Proteine zu gewinnen. Wie Abb. 5 zeigt, finden sich vor der Zink-Hitze-Fällung entsprechend der Stufenelution mit 5 verschiedenen Konzentrationen 5 Proteingipfel. In jedem Gipfel zeigt sich sowohl $LeuNH_2$-spaltende als auch LEUPA-spaltende Aktivität. Die spezifischen Aktivitäten der $LeuNH_2$-Spaltung sind, wie Abb. 7 zeigt, im 5. Gipfel am höchsten. Hohe spezifische Aktivität findet sich auch im 1. Gipfel. Vom 2. bis 4. Gipfel nimmt jedoch die spezifische Aktivität zunehmend ab. Die spezifischen Aktivitäten der LEUPA-Spaltung sind, wie Abb. 7 zeigt, vor allem im 1. Gipfel enthalten, während die spezifischen Aktivitäten der anderen Gipfel erheblich geringer sind. Am wenigsten spezifische Aktivität weist der 3. Gipfel auf.

Nach der Zink-Hitze-Behandlung ergibt sich ein deutlich verändertes Bild. Wie aus Abb. 6 hervorgeht, sind die Proteingipfel, entsprechend einer Elimination von etwa 75 % der ursprünglichen Proteine, deutlich geringer. Es las-

sen sich wieder 5 verschiedene Proteingipfel voneinander trennen. In jedem dieser Gipfel läßt sich sowohl $LeuNH_2$-spaltende als auch LEUPA-spaltende Aktivität nachweisen. Wie Abb. 8 zeigt, ist im 3. Gipfel die höchste spezifische Aktivität der $LeuNH_2$-Spaltung enthalten. Hohe spezifische Aktivität enthält auch noch der 4. und 5. Gipfel. Im 1. und 2. Gipfel ist dagegen nur sehr wenig spezifische Aktivität nachweisbar. Die spezifische Aktivität der LEUPA-Spaltung ist, wie Abb. 8 zeigt, vor allem im 1. Gipfel lokalisiert, während sie in den übrigen Gipfeln nur noch schwach nachweisbar ist.

Durch den Reinigungsschritt der kombinierten Zink-Hitze-Fällung wurde also der Teil der $LeuNH_2$-spaltenden Aktivität, der bei geringer Ionenstärke eluiert werden konnte und in den ersten zwei Gipfeln enthalten ist, weitgehend eliminiert. Der bei höherer Ionenstärke eluierte Teil der $LeuNH_2$-spaltenden Aktivität im 3., 4. und 5. Gipfel konnte dagegen um ein Mehrfaches angereichert werden. Demgegenüber wurde die LEUPA-spaltende Aktivität in allen Gipfeln deutlich vermindert.

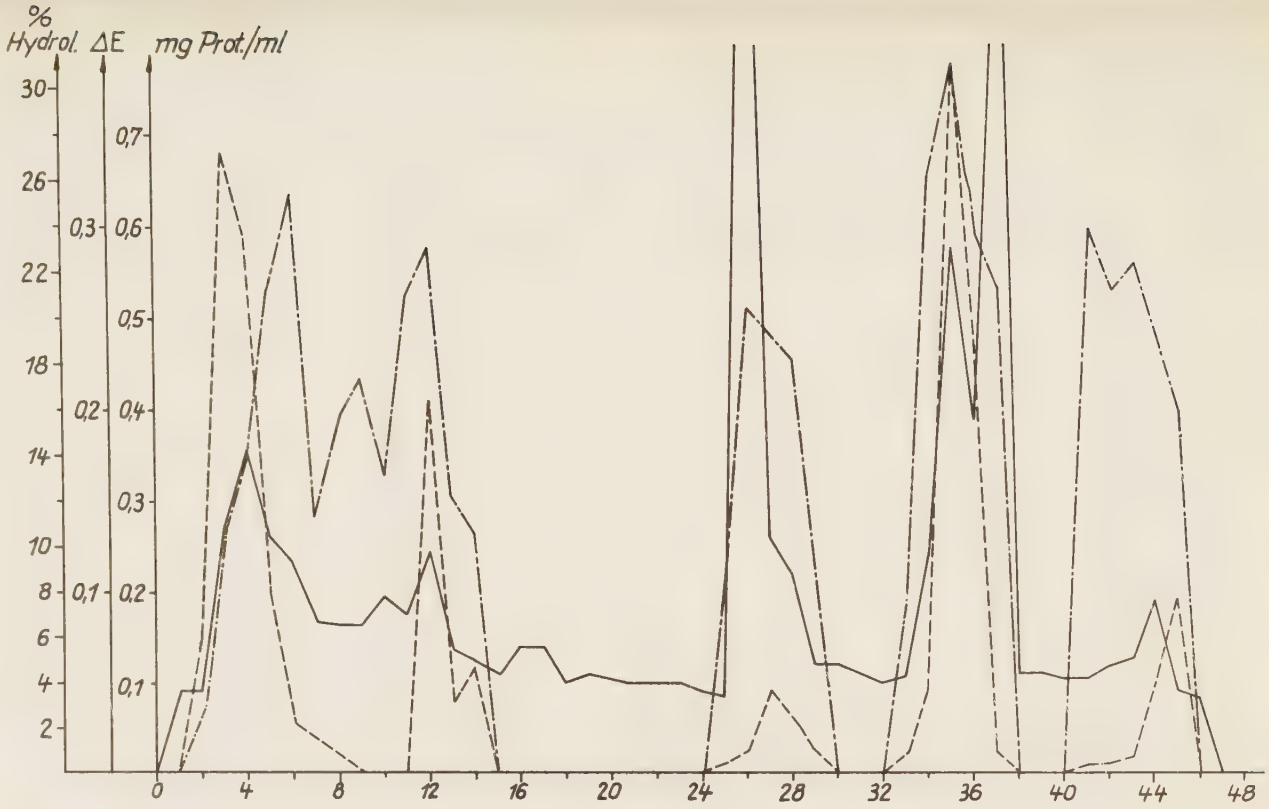


Abb. 5 zeigt ein Chromatogram für rohen Extrakt aus Corpus luteum.
——— Protein, ------ LEUPA-spalt. Aktivität, —— - —— $LeuNH_2$-spalt. Aktivität.

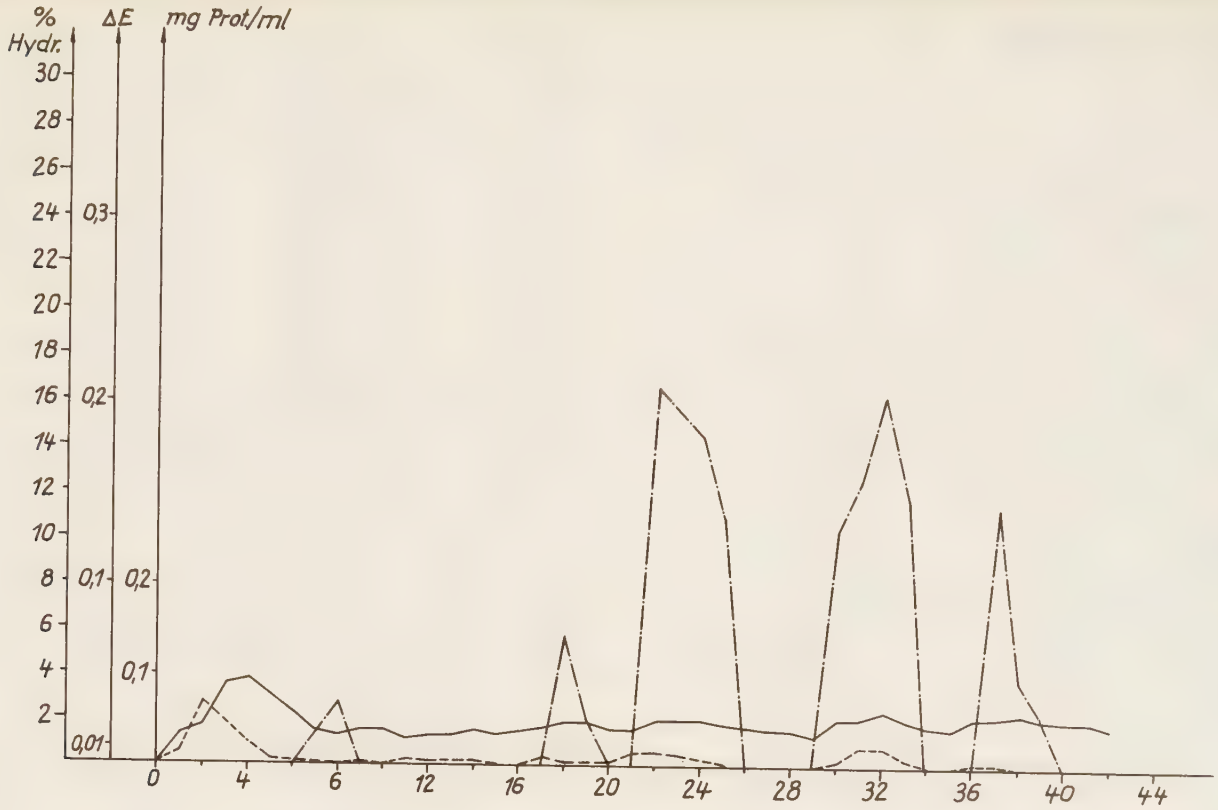


Abb. 6 zeigt ein Chromatogram für hochgereinigten Extrakt aus Corpus luteum.
——— Protein, ------ LEUPA-spalt. Aktivität, —— - —— $LeuNH_2$-spalt. Aktivität.

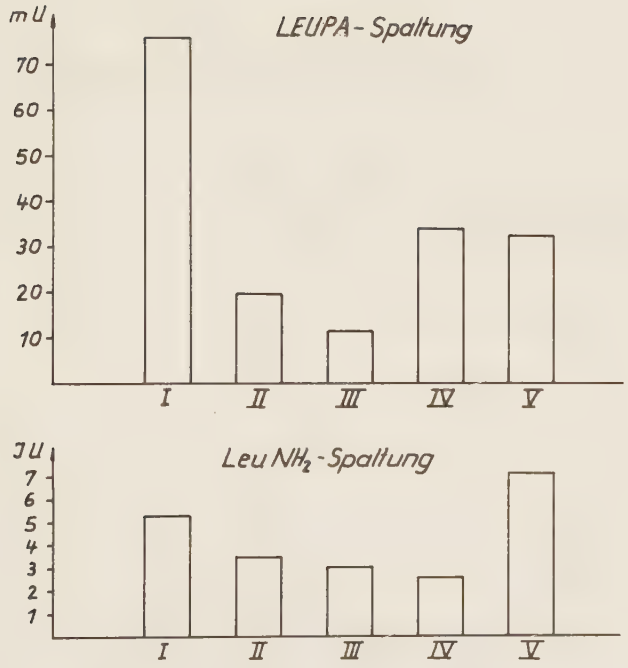


Abb. 7 zeigt die spezifischen Aktivitäten der $LeuNH_2$- und LEUPA-Spaltung aus den 5 Proteingipfeln in rohem Extrakt aus Corpus luteum.

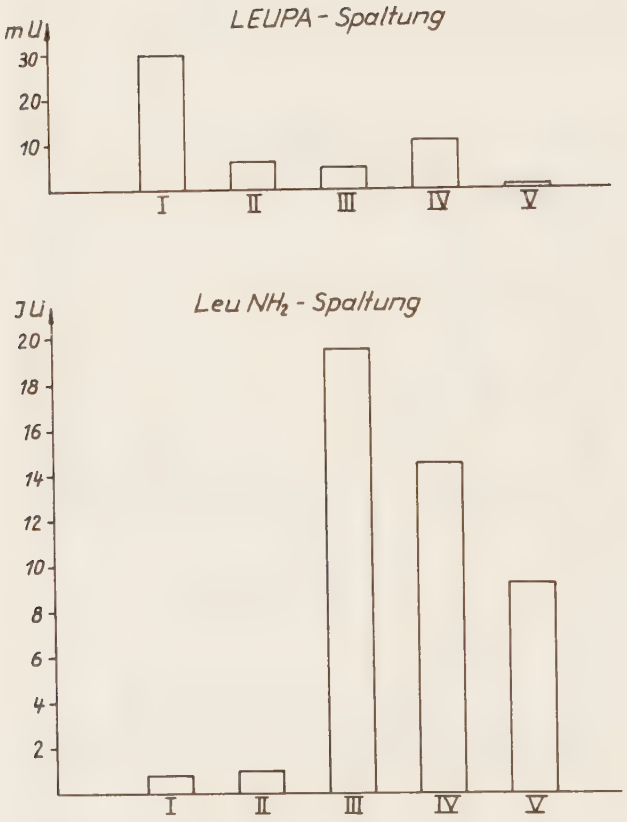


Abb. 8 zeigt die spezifischen Aktivitäten der $LeuNH_2$- und LEUPA-Spaltung aus den 5 Proteingipfeln in hochgereinigtem Extrakt aus Corpus luteum.

VII. DISKUSSION

Nachdem MAHLER (19) im Ovar vom Schwein 5 verschiedene Gipfel LEUNA-spaltender Aktivität säulenchromatographisch voneinander trennen konnte, interessierte die Frage, ob und inwieweit sich in dieser LEUNA-spaltenden Aktivität die LAP verbirgt. Es wurde deshalb als weiteres Substrat $LeuNH_2$ verwendet, für das die LAP eine hohe Spezifität aufweist. Die L-Leucyl-arylamide, zu denen die Substrate LEUNA und LEUPA gehören, werden außer von der LAP, die nur eine sehr geringe Spezifität für diese chromogenen Substrate aufweist, noch von einer Reihe weiterer Peptidasen mit hohen Spaltungsraten umgesetzt (17, 25, 26, 27, 32, 37, 41). DIENSTL (5) sowie NAGEL, WILLIG u. SCHMIDT (22) schlugen deshalb vor, die L-Leucyl-arylamide-spaltenden Enzyme als Aminosäurearylamidasen (AAA) zu bezeichnen. Im Folgenden soll nun erörtert werden, ob die schon von JUNG (13), SCHWÄGERLE (31) und MAHLER (19) nachgewiesene L-Leucyl-arylamide-spaltende Aktivität im Corpus luteum vom Schwein auf die LAP, auf die AAA, oder auf alle diese Enzyme zurückzuführen ist.

1.) Im Corpus luteum vom Schwein konnte in allen Zellfraktionen sowohl $LeuNH_2$- als auch LEUNA-Spaltung nachgewiesen werden. Es zeigte sich aber, daß die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität etwa 5 bis 350 mal höher ist als die von LEUNA. PATTERSON, HSIAO u. KEPPEL (26) konnten jedoch zeigen, daß gereinigte LAP aus Schweineniere $LeuNH_2$ 10 000 bis 20 000 mal schneller hydrolysiert als LEUNA. Im Corpus luteum vom Schwein ist somit die Hydrolyse von LEUNA gegenüber der von $LeuNH_2$ etwa 100 mal höher als in Extrakten, die nur gereinigte LAP enthalten. Es kann daraus geschlossen werden, daß die schon von JUNG (13), SCHWÄGERLE (31) und MAHLER (19) nachgewiesene LEUNA-Spaltung zu einem großen Teil nicht von der LAP, sondern von anderen LEUNA-spaltenden Peptidasen katalysiert wird. Ein Vergleich anderer Organe mit dem Ovar vom Schwein zeigt, daß ebenso wie im Ovar vom Schwein in Mäuseascitestumoren (26), in menschlicher Placenta, in Rattenleber und Rattenniere, sowie in Rinderaugenlinse (11) $LeuNH_2$ viel besser als LEUNA gespalten wird. Demgegenüber wird im Serum von Normalpersonen und besonders in dem von Schwangeren LEUNA besser als $LeuNH_2$ hydrolysiert (11).

Im Corpus luteum vom Schwein fanden sich die höchsten $LeuNH_2$-spaltenden Aktivitäten in der Cytoplasmafraktion, während in den übrigen Zellfraktionen jeweils weniger als die Hälfte dieser $LeuNH_2$-Hydrolyse katalysiert wurde.

Die höchsten LEUNA-spaltenden Aktivitäten fanden sich demgegenüber in der Mitochondrienfraktion. Auch hier wiesen die übrigen Zellfraktionen jeweils weniger als die Hälfte der Aktivität der Zellfraktion mit der höchsten Spaltungsrate auf. Dieses Ergebnis konnte von SCHWÄGERLE (31) insofern bestätigt werden, als auch SCHWÄGERLE (31) die höchsten LEUNA-spaltenden Aktivitäten im Corpus luteum vom Schwein in der Mitochondrienfraktion nachwies, während die übrigen Zellfraktionen jeweils weniger als die Hälfte dieser Aktivität enthielten. Andere Autoren kamen in Untersuchungen in anderen Organen zu verschiedenen Ergebnissen: So wurden in der Niere die höchsten LEUNA-spaltenden Aktivitäten fast ausschließlich in der Mikrosomenfraktion (21), in der Skelettmuskulatur (20), sowie in Mäuseascitestumoren (26) vorwiegend in der Cytoplasmafraktion und in der Leber (20, 32) schließlich über alle Zellfraktionen hinweg gleichmäßig verteilt gefunden.
Im Gegensatz zu diesen verschiedenen Ergebnissen mehrerer Autoren stimmten die Ergebnisse hinsichtlich der $LeuNH_2$-Hydrolyse mit denen sämtlicher Autoren überein. In jedem Falle konnte die $LeuNH_2$-Spaltung überwiegend in der Cytoplasmafraktion gemessen werden (21, 26, 27).

Die verschiedene Verteilung der $LeuNH_2$-spaltenden gegenüber der LEUNA-spaltenden Aktivität auf die einzelnen Zellfraktionen aus Homogenat von Corpus luteum gibt zu der Vermutung Anlaß, daß es sich im Corpus luteum vom Schwein um verschiedene Enzyme handelt, denn ein einheitliches Enzym würde, wenn man sowohl seine $LeuNH_2$- als auch seine LEUNA-Spaltung mißt, jedesmal dieselbe Verteilung seiner Aktivitäten auf die verschiedenen Zellfraktionen aufweisen.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der verschiedenen Autoren bestätigt die Einheitlichkeit der Ergebnisse hinsichtlich der $LeuNH_2$-Spaltung das Vorliegen eines einzigen Enzyms, nämlich der LAP. Dies braucht nicht im Widerspruch zu dem Nachweis mehrerer $LeuNH_2$-spaltender Enzyme zu stehen, da diese Enzyme im Gegensatz zur LAP sehr geringe Spaltungsraten an $LeuNH_2$ aufweisen. Die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Autoren hinsichtlich der Lokalisation der LEUNA-Hydrolyse könnten auf das Vorliegen verschiedener LEUNA-spaltender Enzyme hinweisen. Dies würde im Einklang mit dem Begriff Aminosäurearylamidasen stehen, der einen Sammelbegriff für mehrere L-Leucyl-arylamidespaltende Enzyme darstellt.

2.) Die für die weiteren Versuche notwendige Reinigung von Cytoplasma nach der von HANSON, GLÄSSER u. KIRSCHKE (12) angegebenen Methode der kombinierten Zink-Hitze-Behandlung geschah einmal mit dem Ziele, die LAP, für deren Vorliegen im Corpus luteum vom Schwein, wie oben ausgeführt wurde, Hinweise erhalten werden konnten, anzureichern. Das andere Ziel, das mit der Reini-

gung des Extraktes verfolgt wurde, war, weitere Klarheit über die Natur der L-Leucyl-arylamide-spaltenden Aktivität zu erhalten, die hier mit LEUPA als Substrat nachgewiesen wurde. So darf angenommen werden, daß eine gleichzeitige Anreicherung sowohl der $LeuNH_2$- als auch der LEUPA-spaltenden Aktivität durch dasselbe Zink-Hitze-Verfahren auf das Vorliegen von ähnlichen Enzymen hinweist, was insbesondere Ladung und Struktur des Enzymmoleküls anbetrifft. Die Eliminierung der LEUPA- gegenüber der $LeuNH_2$-spaltenden Aktivität oder umgekehrt würde dagegen die Verschiedenheit der Enzyme unterstreichen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die LAP auch LEUPA in geringem Maße zu spalten vermag. Es kann daher nicht gelingen, bei einer Anreicherung der LAP die LEUPA-Spaltung ganz zu entfernen.

Die Ergebnisse zeigen nun, daß im hochgereinigten Extrakt mit einem Heterogenitätsquotienten von 24,1 die $LeuNH_2$-Spaltung gegenüber der LEUPA-Spaltung um das 24,1 fache zugenommen hat. Dabei konnte die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität um das 1,97 fache angereichert werden; die LEUPA-spaltende Aktivität wurde dagegen um das 12,2 fache vermindert. SPECTOR (36) sowie HANSON, GLÄSSER u. KIRSCHKE (12) erreichten in Rinderaugenlinsenextrakt eine Anreicherung der $LeuNH_2$-spaltenden Aktivität um das 24 bzw. 96 fache. Dies ist wohl damit zu erklären, daß Augenlinsen in vielem andere Stoffwechselleistungen und damit auch einen anderen Gewebsaufbau aufweisen. Es hat sich somit gezeigt, daß die für Rinderaugenlinsen angegebene Methode der kombinierten Zink-Hitze-Behandlung nicht ohne weiteres auf das Corpus luteum übertragbar ist. Doch für die Beantwortung der gestellten Frage nach dem Vorliegen von verschiedenen Enzymen ist weniger das Ausmaß der Anreicherung der $LeuNH_2$-spaltenden Aktivität von Bedeutung, sondern vielmehr ob überhaupt $LeuNH_2$-spaltende Aktivität angereichert werden kann und ob dabei gleichzeitig die LEUPA-spaltende Aktivität eine Zunahme oder eine Verminderung erfährt. Wie die Ergebnisse zeigen, wird mit der Eliminierung der LEUPA-spaltenden Aktivität und der Anreicherung der $LeuNH_2$-spaltenden Aktivität somit weiter bekräftigt, daß die von JUNG (13), SCHWÄGERLE (31) und MAHLER (19) nachgewiesene L-Leucyl-arylamide-spaltende Aktivität nicht auf die LAP zurückgeführt werden kann, sondern daß andere Peptidasen dieser Aktivität zugrunde liegen, die außer ihrem Unvermögen, $LeuNH_2$ zu spalten, auch eine andere Struktur und dementsprechend eine andere Ladung aufweisen müssen.

3.) Als nächstes wurde die Wirkung von Mn^{++}-Ionen auf die $LeuNH_2$- und L-Leucyl-arylamide-spaltende Aktivität in rohem, in Sephadex-gereinigtem und in Zink-Hitze-gereinigtem Cytoplasma untersucht. Die L-Leucyl-arylamid-Spaltung wurde mit LEUPA als Substrat nachgewiesen. Es zeigte sich, daß

Mn^{++} die $LeuNH_2$-Hydrolyse in jedem Falle aktiviert, wobei die Aktivierung in rohem und in Sephadex-gereinigtem Extrakt 26,7 bzw. 23,5 % beträgt, also etwa gleich stark ist. In hochgereinigtem Extrakt ist jedoch die Aktivierung etwa 4 mal höher als vor diesem Reinigungsschritt. Im Gegensatz hierzu vermag Mn^{++} die LEUPA-Spaltung nur im hochgereinigten Extrakt zu aktivieren und zwar etwa im selben hohen Maße wie die $LeuNH_2$-Spaltung. Die Mn^{++}-Aktivierung beträgt hier 104,3 %. In rohem Extrakt vermag Mn^{++}, wie dies auch von MAHLER (19) nachgewiesen wurde, die LEUPA-Spaltung nicht zu beeinflussen. Im Sephadex-gereinigten Extrakt hemmt Mn^{++} die LEUPA-Hydrolyse um 57,5 %.

Diese Ergebnisse hinsichtlich der Mn^{++}-Wirkung auf die $LeuNH_2$-Spaltung stehen im Einklang mit den von mehreren Autoren an verschiedenen Organen erhaltenen Ergebnissen: In menschlichem Serum und menschlicher Placenta, in Rattenleber und Rattenniere (11), in Rinderaugenlinse (12) und Mäuseascitestumoren (26) konnte übereinstimmend eine Mn^{++}-Aktivierung festgestellt werden. Die stärkere Mn^{++}-Aktivierung im hochgereinigten gegenüber weniger gereinigtem Extrakt konnte auch von HANSON, GLÄSSER u. KIRSCHKE (12) nachgewiesen werden. Sie kann damit erklärt werden, daß in weniger gereinigtem Extrakt mehr Proteine vorhanden sind, mit denen Mn^{++} ebenfalls wie mit dem Enzymprotein eine Bindung eingeht, so daß das restliche Mn^{++} nicht mehr zu einer maximalen Enzymaktivierung ausreicht.
Hinsichtlich der Wirkung von Mn^{++} auf die LEUPA-Spaltung kommen die verschiedenen Autoren zu verschiedenen Ergebnissen: So vermag Mn^{++} in Rattenleber und Rattenniere sowie in Rinderaugenlinse (11) zu aktivieren. Im menschlichen Serum und menschlicher Placenta (11) sowie in Mäuseascitestumoren (26) hemmt jedoch Mn^{++}.
Da auch die LAP durch Mn^{++} aktiviert wird (12, 34), kann die Mn^{++}-Aktivierung der $LeuNH_2$-Spaltung im Corpus luteum vom Schwein somit als weiterer Hinweis auf das Vorliegen der LAP in diesem Organteil angesehen werden. Andererseits wird deutlich, daß die durch Mn^{++} nicht zu beeinflussende LEUPA-Spaltung in rohem Extrakt und die von Mn^{++} gehemmte LEUPA-Spaltung in Sephadex-gereinigtem Extrakt nicht auf die durch Mn^{++} aktivierte LAP zurückgeführt werden kann. Dies steht auch im Einklang mit den Ergebnissen von DIENSTL (5), der die L-Leucyl-arylamid-Hydrolyse auf Enzyme zurückführte, die von Mn^{++} nicht beeinflußt oder sogar gehemmt werden, und die er Aminosäurearylamidasen nannte.
Es muß aber noch erwähnt werden, daß die starke Mn^{++}-Aktivierung der LEUPA-Spaltung in hochgereinigtem Extrakt nicht auf das Vorliegen von L-Leucyl-arylamide-spaltenden Enzymen hinweist, da diese von Mn^{++} nicht aktiviert werden können. Da nun, wie oben schon ausgeführt, im hochgereinig-

ten Extrakt die L-Leucyl-arylamide-spaltenden Enzyme eliminiert und die LAP angereichert wurde, ist es möglich, daß die Mn^{++}-Aktivierung der LEUPA-Spaltung von der LAP verursacht wird.

Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Proben, denen kein Mn^{++} zugefügt wurde, die aber mit den Mn^{++}-haltigen Proben mitgeführt wurden, um das Maß der Mn^{++}-Aktivierung feststellen zu können, zeigt, daß die $LeuNH_2$-Spaltung im hochgereinigten Extrakt um das 4,05 fache gegenüber der in rohem Extrakt zugenommen hat. Im Gegensatz dazu nahm die spezifische Aktivität der LEUPA-Spaltung um das 4,6 fache gegenüber der in rohem Extrakt ab. Die Aktivitätsanreicherung bzw. -minderung erfolgte dabei hauptsächlich durch die Zink-Hitze-Behandlung des Extraktes. Es konnte hier also wieder bestätigt werden, daß durch diesen Reinigungsschritt die Enzymaktivitäten voneinander getrennt werden können, was wiederum auf ihre verschiedene Natur hinweist.

4.) Die inhibierende Wirkung von EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure) auf die beiden verschiedene Substrate spaltenden Aktivitäten wurde in rohem sowie in Sephadex-gereinigtem Cytoplasma geprüft. Im rohen Extrakt wurde die $LeuNH_2$-Hydrolyse vollständig, im Spehadex-gereinigten Extrakt um 80,9 % gehemmt. Gleichzeitig wurde durch EDTA aber auch die L-Leucyl-arylamid-Hydrolyse, die hier mit LEUPA als Substrat nachgewiesen wurde, gehemmt: Die Hemmung betrug in rohem Extrakt 76 %, in Sephadex-gereinigtem Extrakt 81 %. In jedem Falle konnte also eine stark inhibierende Wirkung von EDTA festgestellt werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen verschiedener Autoren, wonach sowohl LAP aus Schweineniere (4) als auch eine aus menschlicher Leber stammende Aminosäurearylamidase (32) durch EDTA gehemmt werden.

Da EDTA mit vielen zweiwertigen Kationen einen sehr stabilen Metallkomplex bildet, wird in dem System EDTA-Metallion $\rightleftarrows$ EDTA + Metallion + Enzym $\rightleftarrows$ Metallion-Enzym, wobei mit SMITH u. SPACKMAN (34) sowie BRYCE u. RABIN (4) eine feste Bindung zwischen Metallion und Enzym angenommen wird, das Gleichgewicht auf Grund der größeren Dissoziationskonstante von $[\text{Enzym}] \cdot [\text{Metallion}] / [\text{Enzym-Metallion}]$ auf Seiten des EDTA-Metallionkomplexes liegen. Dadurch wird aber dem Enzym das für seine katalytische Wirkung benötigte Metallion entzogen und somit gehemmt. Es kann deshalb angenommen werden, daß die stark inhibierende Wirkung von EDTA sowohl auf die $LeuNH_2$-Hydrolyse als auch auf die Hydrolyse von LEUPA anzeigt, daß beide Aktivitäten durch Metallionen aktiviert werden. Tatsächlich ist bekannt, daß außer der Mn^{++} oder Mg^{++} benötigen-

den LAP (12, 34) auch Aminosäurearylamidasen durch Co^{++} aktiviert werden (32, 39, 41).

Obwohl im Sephadex-gereinigten Extrakt dissoziierte Ionen und Moleküle unter einem Molekulargewicht von 5000 entfernt waren, vermochte EDTA durch Bindung von Metallionen beide Aktivitäten zu hemmen. Dies bekräftigt das Vorliegen der von SMITH u. SPACKMAN (34) sowie BRYCE u. RABIN (4) angenommenen festen Bindung zwischen Mg^{++} oder Mn^{++} und dem LAP-Protein. Diese Ergebnisse deuten darüberhinaus auch das Bestehen einer ähnlichen Bindung zwischen Enzymprotein und Metallion für die Aminosäurearylamidasen an.

Für eine feste Bindung zwischen Enzym und Metallion am LAP- und Aminosäurearylamidasenprotein spricht auch, daß im Sephadex-gereinigten Extrakt die spezifische Aktivität der Proben, die ohne Mn^{++} oder EDTA-Zusatz getestet wurden,keine Verminderung erfuhr, obwohl dieser Extrakt von dissoziierten Ionen befreit war.

5.) Weitere Versuche ergaben, daß nach 6 Tagen Lagerung bei -17° C mit einmaligem Einfrieren und Auftauen in rohem Extrakt die restliche $LeuNH_2$-spaltende Aktivität noch 40 % betrug. Demgegenüber war die L-Leucyl-arylamidespaltende Aktivität, die hier mit LEUPA nachgewiesen wurde, auf 28,6 % der ursprünglichen Aktivität abgesunken. Eine diesem Ergebnis entsprechende höhere Stabilität der $LeuNH_2$-spaltenden Aktivität konnte auch von PATTERSON, HSIAO u. KEPPEL (26) nachgewiesen werden. Somit weist dieses Versuchsergebnis wiederum darauf hin, daß im Corpus luteum vom Schwein die L-Leucylarylamide-splatenden Enzyme vonder LAP verschieden sind.

6.) Durch säulenchromatographische Auftrennung an DEAE-Sephadex A-50 wurden in rohem Extrakt, den 5 verschiedenen Konzentrationsstufen entsprechend, 5 verschiedene Proteingipfel erhalten. In jedem dieser Gipfel zeigte sich sowohl $LeuNH_2$-spaltende Aktivität als auch, die Ergebnisse von MAHLER (19) bestätigend, L-Leucyl-arylamide-spaltende Aktivität, die mit LEUPA als Substrat nachgewiesen wurde. Bei der Stufenelution entspricht jeder Proteinfraktion den durch diese Konzentration aus der Bindung an der Säule freigesetzten Proteinen. Aus den 5 Aktivität enthaltenden Proteingipfeln kann somit nicht gefolgert werden, daß jeder Fraktion ein besonderes Isoenzym entspricht. Doch deutet die Verteilung der Aktivität auf die 5 Gipfel an, daß sowohl die $LeuNH_2$- als auch die LEUPA-spaltende Aktivität heterogen vorliegt. Dies würde mit den Ergebnissen von NAKAGAWA u. TSUJI (24) und PATTERSON, HSIAO, KEPPEL u. SOROF (27) übereinstimmen, die teils chromatographisch, teils elektrophoretisch mehrere Gipfel $LeuNH_2$-spaltender Aktivität voneinander trennen konnten. Dagegen ist schon länger bekannt, daß LEUPA- bzw. LEUNA-Spaltung von mehre-

ren Enzymen katalysiert wird. So ließen sich mehrere Gipfel L-Leucyl-arylamide-spaltender Aktivität im Serum von Gesunden (2), von Schwangeren (41) und von Kranken (14), im Cytoplasma von Rattenleber (27) und von Mäuseascitestumoren (26) und im Duodenalsaft (30) nachweisen und zeigen das Vorliegen mehrerer Aminosäurearylamidasen an.

Die weiteren am Zink-Hitze-behandelten Extrakt durchgeführten chromatographischen Untersuchungen ergaben einmal die Eliminierung der LEUPA-spaltenden Aktivität und zwar aus allen 5 Gipfeln, zum anderen eine Eliminierung der $LeuNH_2$-spaltenden Aktivität aus dem 1. und 2. Gipfel sowie deren Anreicherung im 3., 4. und 5. Gipfel. Da durch die Methode der kombinierten Zink-Hitze-Behandlung die LAP angereichert werden kann (12), könnte die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität im 3. bis 5. Gipfel auf die LAP zurückführbar sein. Andererseits wäre es möglich, daß in den durch Zink-Hitze-Behandlung eliminierten Gipfeln $LeuNH_2$-spaltender Aktivität eine andere $LeuNH_2$-spaltende Peptidase oder Amidase vorliegt. Doch kann ein weiterer Aufschluß über die Natur der beiden, verschiedene Substrate spaltenden Aktivitäten mit der Methode der Stufenelution, wie sie hier durchgeführt wurde, nicht erhalten werden.

Es kann aber gefolgert werden, daß insbesondere durch die Anreicherung von $LeuNH_2$-spaltender Aktivität im 3., 4. und 5. Gipfel und durch die Eliminierung von L-Leucyl-arylamide-spaltender Aktivität aus allen 5 Gipfeln die Verschiedenheit der diese Substrate spaltenden Enzyme auch im Corpus luteum vom Schwein unterstrichen wird. Es besteht Grund, neben dem Vorliegen von Aminosäurearylamidasen auch das der LAP anzunehmen. Das heterogene Vorliegen der $LeuNH_2$-spaltenden Aktivität deutet darauf hin, daß außer der LAP noch andere $LeuNH_2$-spaltende Enzyme vorliegen.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

Im Corpus luteum vom Schwein wurde die Natur der $LeuNH_2$-spaltenden und der L-Leucyl-arylamide-spaltenden Aktivität untersucht.

1.) Aus Untersuchungen verschiedener Autoren geht hervor, daß in allen bis jetzt untersuchten Organen und Organteilen die LAP von den L-Leucyl-arylamide-spaltenden Aminosäurearylamidasen getrennt werden muß.

2.) Durch eigene Untersuchungen konnten folgende Ergebnisse erhalten werden:
a) Die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität ist 5 bis 350 mal höher als die L-Leucyl-arylamide-spaltende Aktivität.
b) Die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität findet sich vor allem im Cytoplasma, die L-Leucyl-arylamide-spaltende Aktivität dagegen vor allem in den Mitochondrien.
c) Durch kombinierte Zink-Hitze-Behandlung von Cytoplasma konnte die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität von der L-Leucyl-arylamide-spaltenden Aktivität getrennt werden. Die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität wurde angereichert, die L-Leucyl-arylamide-spaltende Aktivität wurde dagegen eliminiert.
d) Während die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität in unbehandeltem, in mittels Sephadex G-25 von dissoziierten Ionen und Molekülen unter dem Molekulargewicht von 5000 befreitem und in durch Zink-Hitze-Behandlung von etwa 75 % der ursprünglichen Proteine befreitem Cytoplasma immer durch Mn^{++} aktiviert wurde, war die L-Leucyl-arylamid-Hydrolyse in unbehandeltem Cytoplasma durch Mn^{++} nicht zu beeinflussen, in Sephadex G-25-gereinigtem Cytoplasma zu hemmen und nur in Zink-Hitze-gereinigtem Cytoplasma zu aktivieren.
e) EDTA vermochte sowohl die $LeuNH_2$-spaltende als auch die L-Leucyl-arylamide-spaltende Aktivität in unbehandeltem und in Zink-Hitze-gereinigtem Cytoplasma stark zu hemmen.
f) Nach 6 Tagen Lagerung bei -17^{o} C waren noch 40 % der ursprünglichen $LeuNH_2$-Spaltung vorhanden. Dagegen war die L-Leucyl-arylamide-spaltende Aktivität auf 28,6 % der ursprünglichen Aktivität abgesunken.
g) Es wurden in unbehandeltem und in Zink-Hitze-behandeltem Cytoplasma durch Säulenchromatographie an DEAE-Sephadex A-50 sowohl $LeuNH_2$-spaltende als auch L-Leucyl-arylamide-spaltende Aktivität in mehreren Gipfeln erhalten. Durch den Reinigungsschritt wurde die L-Leucyl-arylamide-spaltende Aktivität in allen Gipfeln vermindert. Die $LeuNH_2$-spaltende Aktivität wurde dagegen zum Teil angereichert, zum Teil aber auch eliminiert.

Daraus und aus den Ergebnissen anderer Autoren wird geschlossen, daß auch im Corpus luteum vom Schwein die $LeuNH_2$-spaltende und die L-Leucyl-arylamide-spaltende Aktivität auf verschiedene Enzyme zurückgeführt werden muß. Neben dem Vorliegen von Aminosäurearylamidasen kann auch das der LAP angenommen werden. Es finden sich Hinweise, daß sowohl die LAP als auch die Aminosäurearylamidasen in aktivem Zustand als feste Enzymmetallkomplexe vorliegen. Das Vorliegen eines oder mehrerer weiterer $LeuNH_2$-spaltender Enzyme neben der LAP wird diskutiert.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. Appel, W.: Aminopeptidases: Specifity and inhibiton by an new kind of inhibitor of animal origin. Vortrag. Abstracts of communications presented at the first meeting of the federation of european biochemical societies (1964).

2. Behal, F.J., C.B. Kanavage and R.D. Hamilton: Separation of leucyl-aminopeptidase components in normal human sera by DEAE-Cellulose column chromatography. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 109, 411 (1962).

3. Bernt, E., u. H.-U. Bergmeyer: In: H.-U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, S. 833: Colorimetrische Bestimmung der Leucinaminopeptidase im Serum. Weinheim: Verlag Chemie 1962.

4. Bryce, G.F. and B.R. Rabin: The function of metal ion in leucine-aminopeptidase and the mechanism of action of the encyme. Bioch. J. 90, 512 (1964).

5. Dienstl, F., S. Sailer, F. Sandhofer und H. Braunsteiner: Spaltung von L-Leucyl-β-Naphthylamid-HCl durch Leukocyten. Klin. W. Schr. 42, 794 (1964).

6. Fasold, H., P. Linhart und F. Turba: Einfache Darstellung hochgereinigter Leucinaminopeptidase durch präparative Elektrophorese und Chromatographie. Biochem. Z. 336, 182 (1962).

7. Fittkau, S., H. Hanson, J. Marquardt, H. Diesner und U. Kettmann: Kristallisierte Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen. Aminosäurezusammensetzung und N-terminale Aminosäuren. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 338, 180 (1964).

8. Glenner, G.G., M.S. Burnstone and D.B. Meyer: A study of amino-peptidase activity in the stroma of neoplastic tissue, with a comparison of histochemical techniques. I. nat. Cancer Inst. 23, 857 (1959).

9. Grassmann, W. and W. Heyde: Alkalische Mikrobestimmung der Aminosäuren und Peptide. Z. physiol. Chem. 183, 32 (1929).

10. Green, M.N., K.-C. Tsou, R. Bressler and A.M. Seligman: The colorimetric determination of leucine aminopeptidase activity with L-Leucyl-β-naphthylamide-hydrochloride. Arch. Biochem. 57, 458 (1955).

11. Hanson, H., P.Bohley und H.G. Mannsfeldt: Zur Verwendung von L-Leucyl-β-Naphthylamid als spezifisches Substrat für Bestimmungen von Leucinaminopeptidase. Clin. chim. Acta (Amst.) 8, 555 (1963).

12. Hanson, H., D. Gläßer und H. Kirschke: Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen. Kristallisation, Eigenschaften und optimale Wirkungsbedingungen des Enzyms. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 340, 107 (1965).

13. Jung, G.: Untersuchungen über proteolytische Enzyme des Ovariums. Habilitationsschrift Tübingen 1962.

14. Kowlessar, O.D., L.J. Haeffner and M.H. Sleisinger: Localisation of leucine aminopeptidase in serum and body fluids by starch gel electrophoresis. J. clin. Invest. 39, 671 (1960).

15. Kresser, M. und H.-J. Woraschk: Untersuchungen an Peptidasen des menschlichen Fruchtwassers. Z. Geburtsh. u. Gyn. 162, 2, 207 (1963).

16. Kretschmer, K. und H. Hanson: Kristallisierte Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen. Physikalische Konstanten, I. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 340, 126 (1965).

17. Krisch, K.: Isolierung einer Esterase aus Lebermikrosomen. Münchner med. Wschr. 105, 488 (1963).

18. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).

19. Mahler, U.: Über die Heterogenität der sogenannten Leucinaminopeptidase (LAP) im Ovarium vom Schwein. Inauguraldissertation, Tübingen 1965.

20. Maver, M.E. und A.E. Greco: The intracellular distribution of cathepsine, bencoylarginine amidase and leucine amidase and leucine amidase activities in normal rat tissues and primary rat hepatoma. J. Natl. Cancer Inst. 12, 37 (1951).

21. Nagel, W. und F. Willig: Verteilung von proteolytischen Enzymen in Organen und Zellbestandteilen. Naturwissenschaften 51, 115 (1964).

22. Nagel, W., F. Willig und F.H. Schmidt: Über die Aminosäurearylamidase- (sog. Leucinaminopeptidase-) Aktivität im menschlichen Serum. Klin. Wschr. 42, 447 (1964).

23. Nakagawa, S. and H. Tsuji: Electrophoretic separation of leucine aminopeptidase and leucyl-β naphthylamide-splitting encyme. Clin. chim. Acta (Amst.) 10, 572 (1964).

24. Nakagawa, S. and H. Tsuji: Multiplicity of leucineamide-splitting encymes in normal and hepatitis sera. Clin. chim. Acta 155 (1966)

25. O'Connell, W. and R.J. Winzler: Studies on an encyme in human serum which hydrolyzes L-leucyl-β naphthylamide. Cancer Res. 23, 78 (1963).

26. Patterson, E.K., S.H. Hsiao and A. Keppel: Studies on dipeptidases and aminopeptidases. I Distinction between leucine aminopeptidase and encymes that hydrolyse L-leucyl-β - naphthylamide. J. Biol. Chem. 238, 3611 (1963).

27. Patterson, E.K., S.H. Hsiao, A. Keppel and S. Sorof: Studies on dipeptidase and aminopeptidases. II Zonal electrophoretic separation of rat liver peptidases. J. Biol. Chem. 240, 2, 710 (1955).

28. Schneider, W.C.: in Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse, 10. Auflage, 2. Band, S. 564: Fraktionierung eines Rattenleberhomogenates in isotonischer (0,25 M) Rohrzuckerlösung.

29. Schobel, B. und F. Wewalka: Die Heterogenität der Leucinaminopeptidase. Untersuchungen von Organen und Serum bei Leber-Gallen-, und Pankreaserkrankungen. Klin. Wschr. 40, 1048 (1962).

30. Schobel, B. und F. Wewalka: Über die sogenannte Leucinaminopeptidase der Duodenalschleimhaut und des Duodenalsaftes.

31. Schwägerle, G.: Glycylglycin-Dipeptidase und Leucinaminopeptidase im Ovar des Menschen und des Schweins. Inauguraldissertation,Tübingen 1962.

32. Smith, E.E., J.T. Kaufman and A.M. Rutenburg: The partial purification of an amino-acid-naphthyl-amidase from human liver. J. Biol. Chem. 240, 4, 1718 (1965).

33. Smith, E.E., E.P. Pineda and A.M. Rutenburg: Localisation of serum leucine aminopeptidase activity by paper electrophoresis. Prc. Soc. exp. Bio. (N.Y.) 110, 683 (1962).

34. Smith, E.L. and D.H. Spackman: Leucine aminopeptidase V. Activation, specifity and mechanism of action. J.Biol. Chem. 212, 271 (1955).

35. Spackman, D.H., E.L. Smith and D.M. Brown: Leucine aminopeptidase IV. Isolation and properties of the encyme from swine kidney. J. Biol. Chem. 212, 255 (1955).

36. Spector, A.: Lens aminopeptidase I. Purification and properties. J. Biol. Chem. 238, 1353 (1963).

37. Sylven, B. and J. Bois: Studies on the histochemical "leucine aminopeptidase" reaction I. Identity of the encymes possibly involved. Histochemie 3, 65 (1962).

38. Unbehaun, V., G. Jung und E. Kidess: Enzymuntersuchungen im Liquor folliculi. Arch. Gyn. 202, 225 (1964).

39. Weber, H.: Vereinfachte Mikromethode zur Bestimmung der Leucinaminopeptidase im Serum. Clin. Chim. Acta, 10, 521 (1964)

40. Wintersberger, E. und H. Tuppy: Zonen-Elektrophorese von Aminopeptidasen in Stärkegel. Mh. Chem. 91, 406 (1960).

41. Wolff, J.B. and R.A. Resnik: Aminopeptidase of ocular lens. Metal-ion requirements and synergistic activation. Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 73, 588 (1963).

Lebenslauf

Am 11.7.1939 wurde ich, Jörg Wandel, als Sohn des Textilkaufmanns Friedrich Wandel und seiner Ehefrau Hilde, geb. Hornung, in Tübingen geboren. Von 1946 bis 1950 besuchte ich die Grundschule in Kirchentellinsfurt und trat dann in das Kepler-Gymnasium Tübingen ein. Nach der Mittleren Reife im Frühjahr 1956 wechselte ich auf die Wirtschaftsoberschule in Reutlingen über, wo ich im März 1959 das Wirtschaftsabitur bestand. Anschließend diente ich als Wehrpflichtiger ein Jahr bei der Bundeswehr. Ab Mai 1960 studierte ich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen Volkswirtschaft. Nach dem Bestehen des Ergänzungsabiturs am Johannes-Kepler-Gymnasium in Reutlingen im März 1961 begann ich mein Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Dort bestand ich im Oktober 1962 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im Oktober 1964 die ärztliche Vorprüfung und im Februar 1968 das Medizinische Staatsexamen.